

30.11

a22/647

B-  
C/3922

**HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA-  
COMPLETA (W-CGH): UNA TÉCNICA PARA LA  
DETECCIÓN DE DIFERENCIAS ENTRE  
GENOMAS EN SUS SECUENCIAS DE ADN  
ALTAMENTE REPETIDAS.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID REGISTRO GENERAL
Entrada 01 Nº. 200700000410 15/01/07 16:16:03

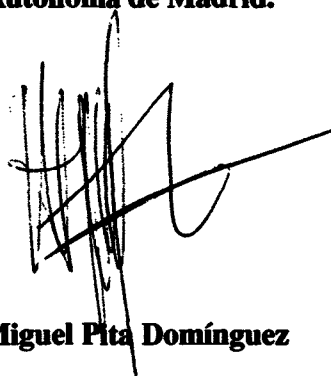


**Tesis Doctoral  
Miguel Pita Domínguez  
Enero de 2007**

Reg. F.C.  
44 311

**HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA-COMPLETA (W-CGH):  
UNA TÉCNICA PARA LA DETECCIÓN DE DIFERENCIAS ENTRE  
GENOMAS EN SUS SECUENCIAS DE ADN ALTAMENTE REPETIDAS.**

**Memoria que presenta Miguel Pita Domínguez para optar al grado de  
Doctor en Ciencias (Biológicas) por la Universidad Autónoma de Madrid.**



**Miguel Pita Domínguez**

**Vº Bº del director de la tesis doctoral:**



**Jaime Gosálvez Berenguer  
Catedrático de Genética  
Departamento de Biología  
Universidad Autónoma de Madrid**



### **ABREVIATURAS**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNsat:** ADN satélite

**ADNss:** ADN de cadena sencilla

**B:** azul

**CAB:** *Microtus cabrae*

**CC:** Código Celular

**D:** donante

**DAPI:** 4',6-Diamidino-2-Fenilindol

**DIA:** Análisis Digital de Imágenes

**DU:** raza Duroc

**FISH:** Hibridación *in situ* Fluorescente

**G:** verde

**I:** raza Ibérica

**L:** raza Landrace/Large White

**MA:** millones de años

**NIV:** *Microtus nivalis*

**R:** rojo

**RC:** receptor

**W-CGH:** Hibridación Genómica Comparativa-Completa

## **ÍNDICE**

<b>1 RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
2.1 <i>Los genomas: pasado y presente.....</i>	<i>14</i>
2.2 <i>Los genomas: composiciones complejas de secuencias de ADN.....</i>	<i>17</i>
2.3 <i>El ADN satélite (ADNsat) .....</i>	<i>19</i>
2.4 <i>La heterocromatina constitutiva .....</i>	<i>22</i>
2.5 <i>Polimorfismos en la heterocromatina constitutiva .....</i>	<i>23</i>
2.6 <i>Los genomas examinados a través de la hibridación de ácidos nucleicos....</i>	<i>24</i>
2.7 <i>Hibridación in situ Fluorescente (FISH), Hibridación Genómica Comparativa (CGH) e Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) ....</i>	<i>26</i>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 <i>Materiales .....</i>	<i>32</i>
4.2 <i>Métodos.....</i>	<i>34</i>
4.2.1 <i>Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) e Hibridación in situ Fluorescente (FISH) .....</i>	<i>34</i>
4.2.1.1 <i>Preparación de las células.....</i>	<i>34</i>
4.2.1.2 <i>Preparación de la Sonda Híbrida (SH) .....</i>	<i>35</i>
4.2.1.2.1 <i>Obtención de ADN genómico .....</i>	<i>36</i>
4.2.1.2.2 <i>Marcado de los genomas.....</i>	<i>36</i>
4.2.1.3 <i>Hibridación.....</i>	<i>37</i>
4.2.1.4 <i>Revelado de la hibridación .....</i>	<i>38</i>
4.2.1.5 <i>Análisis Digital de Imagen (DIA) de los resultados de W-CGH y FISH .....</i>	<i>39</i>
4.2.2 <i>Bandas-C.....</i>	<i>41</i>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 <i>Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) intra-específica. 42</i>	<i>42</i>
5.1.1 <i>Homo sapiens.....</i>	<i>42</i>
5.1.1.1 <i>Caracterización de los polimorfismos .....</i>	<i>42</i>
5.1.1.2 <i>Aplicación para la cuantificación del grado de quimerismo post-trasplante de médula ósea (post-TMO).....</i>	<i>43</i>
5.1.2 <i>Sus domesticus .....</i>	<i>46</i>
5.2 <i>W-CGH inter-específica .....</i>	<i>50</i>
5.2.1 <i>El género Microtus.....</i>	<i>50</i>

5.2.1.1	<i>Localización de MSAT-160 en Microtus cabreræ y Microtus nivalis mediante FISH</i> .....	51
5.2.1.2	<i>Microtus cabreræ vs. Microtus nivalis</i> .....	51
5.2.2	<i>El género Arcyptera</i> .....	54
5.3	<b>W-CGH inter-genérica</b> .....	56
5.3.1	<i>Homo sapiens, Pan troglodytes, Gorilla gorilla y Chlorocebus aethiops</i> .....	56
5.3.1.1	<i>Resultados cualitativos</i> .....	57
5.3.1.2	<i>Resultados Cuantitativos: Identidad Citogenética (IC)</i> .....	60
5.4	<b>Aplicación de la W-CGH para la localización y caracterización de Lugares Lábilés Alcalinos (LLA)</b> .....	61
5.4.1	<i>Sus domesticus</i> .....	62
5.4.2	<i>Ovis aries</i> .....	63
6	<b>DISCUSIÓN</b> .....	66
6.1	<b>¿Qué nos ayuda a resolver la Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH)?</b> .....	67
6.2	<b>W-CGH intra-específica</b> .....	71
6.2.1	<i>Homo sapiens</i> .....	71
6.2.1.1	<i>La cuantificación del grado de quimerismo post-trasplante de médula ósea (post-TMO): un problema no resuelto</i> .....	72
6.2.2	<i>Sus domesticus</i> .....	76
6.2.2.1	<i>Autosomas</i> .....	77
6.2.2.2	<i>El cromosoma Y</i> .....	79
6.3	<b>W-CGH inter-específica</b> .....	80
6.3.1	<i>El género Microtus</i> .....	80
6.3.2	<i>El género Arcyptera</i> .....	83
6.4	<b>Hibridación Genómica Comparativa Completa intra-genérica</b> .....	84
6.4.1	<i>Homo sapiens, Pan troglodytes, Gorilla gorilla y Chlorocebus aethiops</i> .....	84
6.4.1.1	<i>Resultados cualitativos</i> .....	86
6.4.1.2	<i>Resultados cuantitativos: la identidad citogenética (IC) y las distancias génicas</i> .....	89
6.5	<b>Aplicación de la W-CGH para la localización y caracterización de Lugares Lábilés Alcalinos (LLA)</b> .....	95
7	<b>CONCLUSIONES</b> .....	98
8	<b>TABLAS</b> .....	104

<b>9 ANEXO 1: RELACIÓN DE SONDAS HÍBRIDAS (SHS) Y PREPARACIONES .....</b>	<b>192</b>
<b>9.1 <i>Homo sapiens</i> .....</b>	<b>192</b>
<b>9.2 <i>Sus domesticus</i>.....</b>	<b>192</b>
<b>9.3 <i>El género Microtus</i>.....</b>	<b>194</b>
<b>9.4 <i>El género Arcyptera</i>.....</b>	<b>195</b>
<b>9.5 <i>Homo sapiens, Pan troglodytes, Gorilla gorilla y Chlorocebus aethiops</i>....</b>	<b>195</b>
<b>9.6 <i>Aplicación de la W-CGH para la localización y caracterización de Lugares Lábilés Alcalinos (LLA)</i>.....</b>	<b>196</b>
<b>10 ANEXO 2: ANÁLISIS DIGITAL DE IMÁGENES (DIA) .....</b>	<b>200</b>
<b>11 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>204</b>

## 1 RESUMEN

A medida que se profundiza más en el conocimiento de la composición de los distintos genomas, se acumula más información sobre las características de las secuencias que se presentan más divergentes entre estos. Sin embargo, en un nivel intra-específico desvelar las diferencias existentes no es una tarea sencilla. Teniendo en cuenta que las regiones del genoma que tienen mayor capacidad para cambiar son aquellas que por su incapacidad para producir poblaciones de ARN mensajeros no se someten directamente al filtro de la *selección natural*, nos parece coherente presumir que la mayor parte de las diferencias acumuladas entre dos genomas cualesquiera conciernen a las secuencias de ADN altamente repetido.

Para estudiar este particular tipo de diferencias entre genomas hemos diseñado una técnica, la Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH), que se presenta y se describe como una herramienta eficaz para la detección, localización física y cuantificación de diferencias entre dos genomas en sus secuencias de ADN altamente repetidas. Esta técnica citogenética es una variante de la Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de ácidos nucleicos, frente a la que presenta la notable diferencia de que, mientras que la FISH permite localizar físicamente secuencias concretas, la W-CGH pone de manifiesto las diferencias que existen en la *abundancia relativa y composición* de esas secuencias entre los genomas que se comparan.

La esencia de la metodología consiste en establecer una competición entre dos genomas completos procedentes de dos individuos (de la misma o distinta especie) por hibridar sobre un genoma *referencia* preestablecido. Básicamente el protocolo de la W-CGH comprende la producción de una Sonda Híbrida (SH) en la que se encuentran cantidades equimolares de los ADNs genómicos de los dos individuos a comparar, modificados de modo que puedan ser detectados mediante fluorescencia utilizando dos emisiones distintas (por ejemplo, emisión en rojo y en verde). Las diferencias que presenten los genomas que se comparan en determinadas regiones cromosómicas, se detectarán en forma de hibridación diferencial de estos sobre el genoma *referencia*. La cantidad de sonda hibridada es proporcional a la homología de las secuencias con el material genético sobre el que se hibrida y al número de copias presente de cada secuencia concreta en cada uno de los genomas comparados. El genoma que presente un mayor número de copias de una determinada secuencia desplazará parcialmente al *competidor* en la hibridación de ese determinado *locus* sobre el material genético del genoma *referencia*. Esta técnica permite poner de manifiesto diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre las secuencias de los genomas comparados, siendo las diferencias en secuencias de ADN altamente repetido las que las características de la técnica permite observar con un mayor poder de resolución. Además la W-CGH se muestra como una técnica polivalente, permitiendo tanto detectar diferencias entre individuos de la misma especie como entre genomas de distintas especies relacionadas evolutivamente.

**En el presente trabajo se muestran las diferencias potenciales que genera la W-CGH al comparar genomas dentro de los niveles específico e intra-específico, y se analiza el potencial de utilización de tales diferencias en disciplinas dispares como el tratamiento de algunos aspectos clínicos en el hombre (cuantificación del quimerismo post-trasplante de médula ósea), interesantes por su aplicabilidad, o en otros campos, informativos en la dimensión evolutiva o estructural de los genomas comparados (estudios con diferentes razas de cerdo doméstico, distintas especies de saltamonte, roedores y primates).**

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 *Los genomas: pasado y presente*

El sistema de ordenación de los organismos de base binomial, creado por el botánico sueco Karl Von Linneo en 1735, que nombra a las especies en latín anteponiendo el nombre genérico al específico, sigue actualmente vigente y ha permitido tipificar el millón y medio de especies descritas hasta la fecha (de las que se sabe que son sólo una pequeña parte de las existentes). Es destacable que en la concepción del orden de Linneo no existiera una idea de cambio relacionado, es decir, no tenía cabida una concepción evolucionista de la organización de los seres vivos. Más bien su afán era colocar a los organismos en un orden lógico que revelase el plan usado por el *Creador*. No fue hasta 1809 con la publicación de la “Filosofía zoológica” de Jean Baptiste de Monet, caballero de Lamarck (1744-1829), cuando se planteó la idea del origen de unas especies a partir de otras, aunque con una perspectiva *post-adaptativa*, hoy rechazada por una abrumadora mayoría de la comunidad científica y conocida como “Lamarckismo”. Finalmente, tras la exposición, interpretación y descripción de los mecanismos básicos de la *Evolución* en el libro “El origen de las especies” (1859) del científico inglés Charles Darwin, la *Teoría de la Evolución* quedó definitivamente presentada ante la comunidad científica. Fue a partir de este momento cuando la descripción y clasificación de las especies abandonó su interés meramente descriptivo y adquirió una importancia evolutiva en la que se integraban las relaciones de parentesco existentes entre ellas.

Los métodos clásicos para elaborar estudios comparativos entre especies, empleaban caracteres variables exclusivamente morfológicos para el establecimiento de relaciones de parentesco. Con el desarrollo progresivo de las metodologías, dichos estudios comenzaron a realizarse, no sólo en base a características meramente morfológicas, sino también empleando otros caracteres físicos, como hormonas (revisión en Stoka, 1999), o incluso sonidos (Payne, 1981). Recursos que han permitido a lo largo de la historia plantear y describir relaciones evolutivas entre individuos, especies y poblaciones. Por el contrario, los métodos actuales dejan de lado las características físicas y se amparan principalmente en la tecnología molecular para llevar a cabo procedimientos como la comparación de moléculas de ADN o de proteínas, con el fin de detectar diferencias entre individuos o especies, toda vez que la esencia hereditaria de lo que somos reside en estos tipos de moléculas.

A principios del siglo XX se produce un auge en la disciplina de la genética promovido por sucesos tales como el redescubrimiento en el año 1900 de las Leyes de Mendel (originarias de 1865) por parte de De Vries, Correns y Tschermak, o la enunciación de la Teoría Cromosómica de la Herencia (Sutton, 1902; Boveri, 1902) e incluso la acuñación del término *genes* para denominar a los elementos hereditarios por parte de Johannsen en 1911. A raíz de estos acontecimientos y acompañada por todo el

cambio ideológico que supuso la revolución industrial para el avance de las técnicas experimentales y la concepción del método científico, la cadencia de descubrimientos en el campo de la genética se mostró casi imparable. Con el descubrimiento de la mutación, y la recombinación como motores de la evolución, los estudios comparativos comenzaron a realizarse en base a los cambios producidos a nivel genético. Gracias a estos nuevos conocimientos teóricos, así como gracias al avance de la biología molecular, los métodos de estudio tomaron una nueva dirección: la genética. Aunque la estructura del ADN no fue descrita hasta 1953 por Watson y Crick, y hasta entonces no se pudieron plantear estudios filogenéticos entre individuos comparando sus secuencias. El primer experimento que demostró la existencia de variación genética a nivel molecular entre poblaciones humanas, fue realizado por Hirsfeld y Hirsfeld en 1919 y en él describían el primer gen humano, el sistema ABO, que determina los distintos grupos sanguíneos. En la década de los 50, tras el notable descubrimiento de Watson y Crick, se reactivó el interés por esta clase de estudios gracias al avance en los conocimientos y las técnicas, que una vez más discurrían paralelos y supusieron la introducción de nuevas disciplinas como la Fenética (Michener y Sokal, 1957) y la Cladística (Hennig, 1966), que proponían clasificaciones en base a la valoración numérica de diversos caracteres y al empleo de rigurosos métodos matemáticos. En sus albores, la obtención de datos para estudios de comparación se realizaba mediante experimentos de reacción cruzada, comparaciones entre la movilidad electroforética de isoenzimas de diversas especies, o del grado de re-hibridación entre dos moléculas de ADN de distintas especies desnaturalizado. Pero pronto estos métodos quedaron obsoletos. Así, por ejemplo, un punto de inflexión crítico se produce con la introducción de las técnicas de clonación de fragmentos de ADN utilizando enzimas de restricción (Linn y Arber, 1968; Meselson e Yuan, 1968) y por supuesto con la secuenciación de ácidos nucleicos. Inicialmente fueron las proteínas (Sanger y Thompson, 1953) y hacia finales de los años 70, el ADN (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger y col., 1977) y el ARN (Peattie, 1979). Estos fueron y son los protagonistas esenciales de esta nueva manera de concebir el análisis de los cambios que sufren las especies. De hecho, estas nuevas metodologías son las empleadas comúnmente en la actualidad, y facilitan el estudio más objetivo y preciso, así como el manejo de sólo cuatro posibles estados (A, C, G y T). El invento de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR; Polimerase Chain Reaction) en 1986 (Mullis, 1990) hizo posible el estudio de diferencias en el ADN de forma revolucionaria, práctica y sencilla. De igual forma, la introducción de la secuenciación automática (Smith y col., 1986) permitió la agilización de este laborioso proceso y abrió el camino hacia las secuenciaciones de genomas completos. Actualmente la comparación de individuos o especies se encuentra lejos de fundamentarse en valoraciones subjetivas sobre diferencias morfológicas como en tiempos pasados. Hoy en día se emplean sofisticadas técnicas de biología molecular que ofrecen, en muchos casos, un soporte incuestionable a los cambios observados.





Algunas de las técnicas empleadas para esta clase de estudios no tratan de determinar concretamente la localización física de las secuencias que presentan diferencias entre las moléculas de ADN de los individuos analizados, sino que se limitan a indicar la existencia de un polimorfismo, siempre y cuando este hecho sea de suficiente utilidad suficiente para los fines deseados. Como por ejemplo el estudio de *Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción* (RFLPs; Restriction Fragment Length Polymorphisms), o de *Polimorfismos de un Nucleótido Sencillo* (SNPs; Single Nucleotide Polymorphisms), o bien el análisis de las diferencias entre individuos empleando *microsatélites*.

Por otro lado, también es práctica habitual para la caracterización de individuos la localización física concreta de determinadas secuencias de ADN sobre los genomas. La utilidad de estas técnicas puede residir tanto en su aplicación para la comparación intra-específica o inter-específica de secuencias, como para el conocimiento físico de la topología del genoma. Para ello, la *Hibridación in situ Fluorescente* (FISH; Fluorescent *in situ* Hybridization) o el mapeo mediante *Sitios Concretos de Secuencia* (STSs; Sequence Tagged Sites;) suelen ser las técnicas más utilizadas. Todas estas técnicas también poseen diversas aplicaciones en una larga lista de disciplinas más allá de la taxonomía, dentro de las cuales la discriminación entre individuos es de suma utilidad, como son la criminología o la medicina. Por ejemplo, la detección de polimorfismos en los que una determinada situación alélica es responsable de una enfermedad es una práctica frecuente en análisis prenatal, como es el caso del diagnóstico de diversos síndromes como el de Prater-Willi y Angelman, o la Fibrosis Quística empleando PCR, o bien el Síndrome de Down y el Cromosoma Filadelfia mediante FISH, así como para la cuantificación del grado de quimerismo post-trasplante de médula ósea, sobre el que discutiremos con mayor profundidad en la presente memoria. Es destacable también el empleo de este tipo de técnicas en criminología, especialmente en medicina forense, y en casos de determinación de la paternidad, ya que el establecimiento de la relación de los alelos o marcadores que presenta una persona concreta permiten caracterizarle de forma inequívoca mediante el establecimiento del llamado *DNA fingerprint* (huella dactilar del ADN) (Jeffreys y col., 1985).

La proliferación de proyectos de secuenciación de genomas, y especialmente la consecución del *Proyecto Genoma Humano* (IHGSC, 2001; Venter y col., 2001) han supuesto un punto de inflexión en la investigación genética. Principalmente debido a la enorme cantidad de información que han generado, pero sin duda también a la cuantiosa apertura de interrogantes que han promovido. El interés que demostrado por conocer los procesos de expresión de los genes, su traducción, su interacción y la cadena de procesos metabólicos que desencadenan, así como las diferencias a este nivel entre individuos de la misma o distinta especie, han sido muy influyentes, si no en el surgir, al menos en el vertiginoso desarrollo de nuevas disciplinas de estudio. Particularmente en el caso del hombre, también ha sido de gran importancia a la hora de promover el interés y su estudio, la observación de cómo leves alteraciones en el genoma pueden

producir cambios fenotípicos o predisponer para padecer una enfermedad. Todos estos motivos han provocado el nacimiento de la llamada era *post-genómica* en la que se intenta explicar aquello que no es posible comprender comprando genomas, es decir se trata de una *genómica funcional* que ha supuesto el impulso de disciplinas como la *proteómica*, la *metabolómica* y la *citómica*, que abandonan el estudio de genomas para intentar comprender los procesos mecanismos genéticos y biológicos que ocurren en los seres vivos. Así como la *genómica* se encarga de descifrar el genoma de los seres vivos, su función, regulación y transmisión; las nuevas *ómicas* tratan de ir más allá. La *proteómica* investiga la función y regulación de las proteínas codificadas por el genoma (proteoma), la *metabolómica* se encarga de estudiar el *status* fisiológico de un organismo, órgano, tejido o célula mediante el estudio de las moléculas no proteicas sintetizadas endógenamente, y la *citómica* tiene como objetivo definir exhaustivamente el fenotipo molecular de la célula que resulta de la interacción entre el genotipo del individuo y los factores externos e internos. Los estudios comparativos dentro de todas estas disciplinas permiten detectar la naturaleza de las diferencias y sus consecuencias fenotípicas a muy distintos niveles. Por este motivo hoy en día se encuentran entre los campos de investigación punteros, tanto en biología descriptiva y evolutiva, como, muy especialmente, en farmacología.

## 2.2 Los genomas: composiciones complejas de secuencias de ADN

Los genomas de todos los organismos eucariotas estudiados presentan una estructura semejante que se caracteriza por la presencia de dos o más moléculas lineales de ADN, cada una de ellas contenida en un cromosoma. Además, todos los eucariotas presentan pequeños genomas mitocondriales, y en el caso de las plantas y otros organismos fotosintéticos, además, un genoma cloroplástico.

Sin embargo una característica que es extremadamente distinta entre los distintos organismos es el tamaño de sus genomas. Un tamaño que varía notablemente desde los 12,1 Mb de *Saccharomyces cerevisiae* hasta los 120000 Mb de *Fritillaria assyriaca*. El incremento del tamaño de los genomas correlaciona hasta cierto punto con el de la complejidad de los organismos, como ilustra el hecho de que los hongos posean los genomas más pequeños y los vertebrados y las plantas con flores los mayores. Sin embargo este aumento en el tamaño no se corresponde en modo alguno con el aumento del número de genes, ya que los organismos menos complejos poseen una mayor proporción de genes respecto al tamaño de sus genomas. Se trata de una organización del genoma más económica en términos de *espacio*, es decir, los genomas de los organismos menos complejos muestran, en general, mayor densidad de genes, menor número medio de *intrones* por gen y menor porcentaje de secuencias altamente repetidas. Estas últimas son en muchos casos responsables de que genomas de organismos semejantes posean tamaños tan dispares (Brown, 2002).

Por tanto, los genomas eucariotas contienen mucho más ADN del estrictamente necesario para la codificación de proteínas. En el caso concreto del genoma humano, su secuenciación ha desvelado que de los aproximadamente 3200 Mb que lo conforman aproximadamente 1200 Mb corresponderían a genes (unas 48 Mb) y secuencias relacionadas (1152 Mb aproximadamente): pseudogenes, fragmentos génicos, e intrones y UTRs. Unas 2000 Mb formarían parte del ADN inter-génico, sin función aparente y que se ha denominado en ocasiones “ADN basura” (IHGSC, 2001; Venter y col., 2001) (Fig. 1), aunque dicha denominación se considera cada vez más desacertada puesto que parece presuntuoso considerar esa fracción tan ingente del genoma “inútil” simplemente porque su significado biológico no está determinado. De dicho ADN inter-génico la vasta mayoría está formada por *secuencias repetidas*, y de acuerdo con las clasificaciones actuales las *secuencias repetidas* se dividen en dos grupos principales atendiendo a su forma de amplificación: i) *secuencias dispersas* (aproximadamente 1400 Mb en el genoma humano) y ii) *ADN repetido en tándem* (unas 600 Mb en el genoma humano). El primer grupo contiene secuencias repartidas de forma aparentemente azarosa por todo el genoma, en eucariotas. Siendo las más abundantes las llamadas *elementos transponibles* (90 Mb en el genoma humano). Este grupo de secuencias se divide a su vez en dos grupos principales atendiendo a sus mecanismos de transposición: Los *retrotransposones* o *elementos de clase I* que realizan su transposición mediante un ARN intermediario (los elementos LTR, LINE y SINE son los más abundantes), y los *elementos de clase II*, que realizan su transposición mediante escisión e integración en otro punto del genoma. Ambos tipos de elementos han sido descritos tanto en procariotas como en eucariotas, y su importancia evolutiva es notable puesto que producen mutaciones al desplazarse de un punto del genoma a otro distinto.

Las secuencias de *ADN repetido en tándem* se encuentran presentes en todos los genomas eucariotas y en general en un número de copias mayor que las *secuencias dispersas*. Se organizan de una forma concreta: mediante una sucesión de copias de una determinada secuencia. Existen tres clases con distintas características: i) los *microsatélites*, formados por secuencias cortas con un tamaño de las unidades de repetición de entre 1 y 5 pares de bases, y con entre 10 y 100 repeticiones sucesivas de las mismas. Son una herramienta muy importante en genética forense debido a que, al ser altamente polimórficos, permiten establecer un patrón de secuencias de ADN único para cada individuo (*DNA fingerprint*). ii) Los *minisatélites* tienen unidades de repetición de hasta 100 pares de bases de tamaño repetidas de forma sucesiva entre 10 y 100 veces. Ambos tipos (i y ii) se encuentran dispersos por todo el genoma, y los *minisatélites* además se localizan en las regiones subteloméricas (Li, 1997). iii) El *ADN satélite* (ADNsat); es el ADN repetido en tándem más abundante en los genomas eucariotas, pudiendo aparecer miles de copias de unidades de repetición con tamaños que oscilan desde cientos hasta miles de pares de bases. Estas largas sucesiones de secuencias repetidas de ADNsat forman bloques de cromatina condensada

diferencialmente que aparecen en las regiones centroméricas y teloméricas dando lugar a la heterocromatina.

### 2.3 *El ADN satélite (ADNsat)*

Debido a la abundancia relativa de un determinado par de bases frente a otro (AT ó GC) presente en secuencias altamente repetidas, se descubrió, centrifugando ADN total con sales (CsCl ó Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), la presencia de una banda separada de la principal a la que se llamó “banda de ADN satélite” (Meselson y col., 57). En el genoma humano el ADNsat se observó añadiendo al proceso ligandos (Hg ó Ag) con afinidad específica por determinados pares de bases. En un principio se describieron cuatro familias de ADN satélite en el hombre: I, II, III y IV (Corneo y col., 67, 70, 71, 72) que son los actualmente denominados “ADNs satélite clásicos”, aunque años después se consideró que el ADN satélite IV, carecía de identidad propia y se estableció que no es sino una fracción del ADN Satélite III (Prosser y col., 1986). Posteriormente, y debido al creciente número de descubrimientos de secuencias altamente repetidas en distintas especies, se complicó la nomenclatura y actualmente se denomina ADNsat a todo aquel que se presenta altamente repetido y compactado, de replicación tardía y organización en tándem, y también se conocen como *secuencias de ADN altamente repetidas* y *ADNs repetidos*. Su localización más abundante tiene lugar en la heterocromatina centromérica (pericentromérica y paracentromérica), además de en los telómeros y, en diversos genomas, como el humano, también en la heterocromatina del brazo largo del cromosoma Y (Tyler-Smith y Willard, 93; Sol y Dubow, 93). El ADNsat centromérico es una fracción de los genomas enigmática y que, al no tratarse de ADN codificante, no recibe la suficiente atención, aunque en el hombre sí se encuentra caracterizado con cierto detalle. En la Figura 2 se resumen las familias de ADNsat centromérico existente en el hombre (que junto con el telomérico y el presente en el brazo largo del cromosoma Y, suponen la totalidad de su ADNsat) (Tyler-Smith y Willard, 1993; Lee y col., 1997).

Una característica llamativa del ADNsat que no se encuentra ni en *mini-* ni *micro-satélites*, es la tendencia a formar largas y complejas series de repeticiones multiméricas. Uno de los ejemplos mejor estudiados es la familia de satélite-alfa, presente en primates. El satélite-alfa en el hombre consiste en una unidad de repetición básica de 171 pb, que se combina en sucesivas mediante duplicación en tándem, creando super-estructuras de unidades de repetición con rangos que van desde dímeros hasta 16-meros (Willard and Waye, 1987; Warburton y col., 1993). Asimismo, y a pesar de que el ADNsat está formado por un número muy elevado de copias de una o varias secuencias no-codificantes, y que, por tanto, no están sometidas, en principio, a una gran presión selectiva para el mantenimiento de su secuencia, se observa que se mantiene muy estable la secuencia de nucleótidos que forman esa secuencia o unidad de

repetición dentro de un determinado genoma (Slamovits y Rossi, 2002). Se trata por tanto de un caso de *evolución concertada*, que es otra característica importante del ADNsat, ya que existe una tendencia hacia la homogenización de cambios entre secuencias altamente repetidas dentro del genoma como consecuencia de los mecanismos de generación de éstas (Dover, 1986; Elder y Turner, 1995). El estudio de las dinámicas del ADNsat, así como la observación tanto de resultados experimentales como de simulaciones, han llevado a formular un *modelo integral de la existencia del ADNsat* (Nijman y Lenstra, 2001). Según este modelo la fase inicial se caracterizaría por rápidas expansiones y contracciones causadas por interacciones que se habrían visto favorecidas por la homogeneidad de las secuencias. A continuación las mutaciones provocarían la aparición de nuevas variantes de secuencias, dificultando la recombinación. En una segunda fase diferentes secuencias se amplificarían o se delecionarían independientemente. Y finalmente la pérdida de homogeneidad sufrida llevaría al fin de las interacciones entre unidades de repetición. Dado que esto supone la posible aparición de nuevas unidades de repetición, podría ocurrir que también implicase la pérdida de unidades de repetición antiguas provocada por la presión selectiva que impone el tamaño del genoma.

Por otro lado, los mecanismos que se han descrito para la amplificación del ADNsat parecen ser bastante esclarecedores a la hora de entender su origen y dinámica. En un principio se propusieron el i) *sobrecruzamiento desigual* y ii) el *deslizamiento en la replicación* como los mecanismos de amplificación de estas secuencias (Walsh, 1987). El primero ocurre cuando dos secuencias se aparean más allá de su región de homología y recombinan durante la meiosis generando un polimorfismo en la longitud de secuencias, acontecimiento que puede ocurrir entre cromosomas homólogos, cromátidas hermanas o incluso dentro de una misma cromátida. Sin embargo, este proceso requiere la existencia previa de algunas repeticiones como prerequisite para que dos regiones puedan aparear sin ser completamente homólogas, aunque existen simulaciones que proponen que esta situación no es indispensable (Smith, 1976). El *deslizamiento en la replicación* ocurre cuando repeticiones continuas y cortas sufren un apareamiento desigual durante la replicación del ADN (Levinson y Gutman, 1987) y la nueva cadena generada presenta distinto número de copias. Este mecanismo ofrece una buena explicación para la formación inicial de secuencias de ADNsat, dando pie a otros mecanismos para generar mayores segmentos de ADNsat (Charlesworth y col. 1994). Diversos científicos han considerado insuficientes estos mecanismos para justificar las grandes amplificaciones y delecciones asociadas al ADNsat y sucesivamente se han propuesto otra serie de mecanismos para explicar el posible origen de estas particulares secuencias. La recombinación intra-cadena entre unidades de repetición del mismo segmento produciría círculos de ADN extra-cromosomales produciendo una delección en dicho segmento. El círculo de ADN podría perderse o producir una amplificación por *círculo rodante* (iii) integrándose en otra región de homología y de esta manera incrementando el número de copias de las unidades de repetición, así como cambios en

la disposición secuencial de éstas (Walsh, 1987). Smith en 1976 y posteriormente Stephan (1989) han demostrado mediante simulaciones que se puede generar ADNsat *de novo* mediante la acción conjunta de mutación, sobrecruzamiento desigual, deslizamiento en la replicación y replicación por *círculo rodante*.

La asignación de una función al ADNsat y a su variante citogenética, la heterocromatina, es un asunto todavía confuso y conflictivo, y es un lugar común de discusión en los campos de la biología evolutiva y de la genética. Después de que los primeros estudios negaran cualquier función relacionada con el ADNsat y lo caracterizaran de “ADN basura” con capacidades parasíticas (Ohno, 1972; Orgel y Crack, 1980), hoy en día se mantiene que el origen y mantenimiento del ADNsat se debe en esencia a su naturaleza “egoísta” es decir, a su capacidad para replicarse en el genoma (Charlesworth y col., 1994). Aunque también se ha propuesto en ocasiones que el ADNsat y las secuencias repetidas en general son de algún modo funcionalmente importantes para el organismo (Britten y Davidson, 1969; Brutlag, 1980; McDonald, 1993; Britten, 1994) o que se mantienen debido a la importancia de su capacidad mutagénica que contribuiría a aumentar el potencial evolutivo a largo plazo de las poblaciones (Nevers y Saedler, 1977; Syvanen, 1984). Sin embargo existen evidencias que demuestran efectos de la heterocromatina en la unión de proteínas relacionadas con la mitosis y meiosis (Brutlag, 1980; John y Miklos, 1988) y hace ya tiempo que se ha propuesto que el satélite-alfa de primates tiene importancia en el funcionamiento del centrómero (Willard, 1998; Koch, 2000). De hecho se ha descrito una unidad corta de repetición llamada “CENP-B box”, característica del satélite-alfa de primates, que representa el lugar de unión de la proteína centromérica CENP-B. También se ha observado que los satélites centroméricos frecuentemente son distintos incluso entre especies cercanas, y estos cambios son paralelos a los observables en las proteínas CENP-A en mamíferos y Cid en *Drosophila* (Henikoff y col., 2001). Incluso se ha afirmado que la evolución rápida que sufren las secuencias centroméricas podría implicar una evolución paralela de las histonas que potencialmente conduciría, o habría conducido, a procesos de especiación (Henikoff y col., 2001, Malik y Henikoff, 2001). De hecho existe un modelo (Csink y Henikoff, 1998) que postula que la especificidad de secuencia de las proteínas que se unen a ADN determina la secuencia de los ADNsat. Es decir, un cromosoma que tenga una ADNsat sólo lo conservará si se une a su heterocromatina una proteína que le proporcionará estabilidad durante la mitosis. Por otro lado podría parecer paradójico que unas secuencias tan variables y en principio tan poco seleccionadas se encuentren localizadas preferentemente alrededor de una estructura tan indispensable como el centrómero. Sin embargo para justificar este hecho se ha sugerido que el ADNsat que forma la heterocromatina pericentromérica tiene una función protectora y tamponadora de los posibles elementos transponibles y mutaciones que se acumulan en el área, así como de la recombinación (Csink y Henikoff, 1998). A pesar del número de descubrimientos existentes referidos a la búsqueda de función de los ADNs repetidos, es conveniente tener presente la frase de Maynard-Smith (1982)

que recuerda que “los efectos no son funciones” porque la confusión se presta cuando se habla de funciones de los ADNs repetidos.

Sin duda uno de los efectos, que no función, que ha hecho recalar mayor interés en los ADNs repetidos es que son un componente muy dinámico de los genomas (Modi 1993b). Debido tanto a sus características como a sus mecanismos de replicación, se les considera más que probables responsables de parte de la plasticidad genómica, así como de una alta proporción de las mutaciones en los cromosomas (Wichman y col., 1991; Bradley y Wichman, 1994). Un ejemplo ideal de este hecho, lo presentan los cromosomas metacéntricos gigantes de *Muntiacus* que han dado lugar a la conclusión de que los elementos satélites I y II de estas especies parecen ser responsables de promover la larga serie de fusiones que han provocado la reducción del número diploide en algunas especies de este género (Li y col., 2000). También se ha propuesto que las diferencias en la estructura y el número cromosómico entre especies cercanas pueden en ciertas circunstancias ser consecuencia de recombinaciones “ilegítimas” entre ADNs repetidos dentro y entre regiones cromosómicas no-homólogas, ocurridas en meiosis (Murphy y col., 2005).

## 2.4 La heterocromatina constitutiva

La heterocromatina fue definida por Heitz en 1928 como “segmentos cromosómicos o cromosomas enteros que se mantienen condensados durante la interfase de la célula mitótica y por tanto aparecen en el núcleo como cromocentros”. Se trata de la primera definición y en ella se describen sólo algunas de las características hoy conocidas de la heterocromatina. Por ser un término acuñado de forma tan temprana, bajo *heterocromatina* se engloban un número heterogéneo de tipos de cromatina. Así como también ocurre que diferentes especies animales muestren comportamientos muy distintos en lo que en ellos también se define como *heterocromatina constitutiva*. Como afirma John en el clásico libro sobre la heterocromatina editado por Verma (1988): “una región inactiva como las correspondientes a la heterocromatina puede ser una zona codificante inactivada o una zona no-codificante”. A partir de esta afirmación se concluye que existen muy distintos tipos de heterocromatina, que actualmente se clasifican en: i) *Heterocromatina tejido-específica*: es eucromatina condensada en una región codificante que no se va a expresar en un tejido concreto. ii) *Heterocromatina facultativa*: surge de la inactivación a largo plazo de una región eucromatica. iii) *Heterocromatina constitutiva*: se distingue por ser permanentemente no-codificante y está constituida principalmente por ADNsat.

La heterocromatina constitutiva, que es la que se estudia en el presente trabajo, es una forma de cromatina altamente condensada que aparece en todas las especies eucariotas. Es característica su ausencia de transcripción y su alta tasa de mutación. Se

puede localizar en varias zonas del genoma (preferentemente en regiones centroméricas, regiones teloméricas y en el brazo largo del cromosoma Y) y, generalmente, está constituida por sucesiones de secuencias de ADN altamente repetidas. La presencia de heterocromatina constitutiva se revela y caracteriza mediante un fuerte tratamiento con hidróxido de bario (o alcali) y calor, de modo que aparece un patrón cromosómico llamado “Bandas-C”, donde sólo se observan las zonas de heterocromatina constitutiva resistentes al tratamiento. En el hombre aparece siempre en zonas próximas al centrómero y en áreas inmediatamente adyacentes a éste (además de en el brazo largo del cromosoma Y). Resulta conflictiva la clasificación y nomenclatura de la heterocromatina porque las bandas-C muestran la presencia de heterocromatina centromérica como un solo bloque, y dentro de éste pueden presentarse de forma continua diversas familias de distintas secuencias de ADNsat que requieren técnicas más precisas para su caracterización. Por este motivo existe un cierto consenso para el empleo de la siguiente nomenclatura: i) *Heterocromatina pericentromérica*: aquella que se encuentra junto a la constricción primaria, está presente en todos los cromosomas y en el genoma humano está constituida por secuencias repetidas de satélite-alfa. ii) *Heterocromatina paracentromérica*: aparece sólo en algunos cromosomas a continuación de la heterocromatina centromérica (o pericentromérica). En el hombre puede estar constituida por cualquiera de las familias de ADNsat, excepto satélite-alfa.

Es destacable entre las características de la heterocromatina que por ser ésta una región no codificante, se considera que sufre cambios rápidos en sus secuencias en comparación con las secuencias únicas o codificantes, que están generalmente más conservadas. Este hecho se propone como uno de los factores promotores de la notable existencia de polimorfismos en la heterocromatina constitutiva.

## 2.5 Polimorfismos en la heterocromatina constitutiva

Las variaciones entre individuos en tamaño, posición y propiedades picnóticas de la heterocromatina constitutiva han sido observadas en todo tipo de organismos desde que White en 1954 describió por primera vez su naturaleza polimórfica en ortópteros. Lubs y Ruddle (1970) ampliaron el margen de observaciones al demostrar que la heterocromatina también era polimórfica en los cromosomas del cariotipo humano, hasta el punto de demostrarse el carácter variable de todos y cada uno de los cromosomas del complemento (McKenzie y Lubs, 1975).

Los polimorfismos encontrados en la heterocromatina constitutiva, y, en otra escala, las variaciones en el ADNsat, pueden ser de dos tipos: i) cambios en la secuencia de nucleótidos (generando un *polimorfismo composición de secuencia*) y ii) cambios en el número de copias de las unidades de repetición (generando diferencias en el tamaño en los bloques de heterocromatina, es decir diferencias en la *abundancia relativa* de



secuencias de ADN altamente repetidas). Debido al hecho de estar constituida por una sucesión de repeticiones de secuencias de ADNsat, así como a causa de la baja presión de selección, es frecuente encontrar diferencias en la *abundancia relativa* de secuencias de ADN altamente repetidas en los bloques de heterocromatina centromérica. Estos polimorfismos se mantienen constantes dentro de un individuo y presentan variaciones en población, ya que, salvo contadas excepciones, el tamaño que presenta un bloque de heterocromatina se hereda de forma mendeliana (Phillips, 1977; Verma, 88). Además del indudable interés poblacional, es muy destacable la utilidad que puede suponer el estudio de polimorfismos en otros campos, como por ejemplo en diagnóstico clínico (Verma, 88; Kalz y Scwanitz, 2004). El análisis de polimorfismos puede revelar contaminaciones de células maternas en cultivos fetales (Hauge y col., 1975) o permitir estudios de paternidad y de determinación de zigosidad en gemelos-mellizos y trillizos (Olson y col., 1986; Kalz y Scwanitz, 2004).

Como se ha dicho las bandas-C son la herramienta más sencilla para detectar heterocromatina constitutiva y por tanto se trata de una metodología elemental para detectar polimorfismos. Desde el primer acercamiento al estudio de polimorfismos en cromosomas de cerdo de Guinea (Bianchi y Aires, 1971), las bandas-C se han usado exhaustivamente con este fin. Otra técnica eficaz es la digestión de cromosomas fijados con enzimas de restricción (Bianchi y col., 1985; Bianchi y Bianchi, 1987) basada en la capacidad de estas enzimas de digerir diferencialmente las distintas familias de ADNsat, lo que también permite poner de manifiesto polimorfismos. Pero no existen muchas más formas de acercamiento a este tipo de estudios. En la presente memoria se describe el empleo de la W-CGH para la detección de polimorfismos en la heterocromatina constitutiva. Así como se ha evaluado la capacidad para generar resultados en los distintos campos de aplicación de esta técnica, cuyo fundamento es la hibridación de ácidos nucleicos.

## **2.6 Los genomas examinados a través de la hibridación de ácidos nucleicos**

La unión complementaria de las secuencias de nucleótidos de una molécula patrón de ADN de doble cadena anti-paralela, es susceptible de disociarse por desnaturalización térmica o química, y, asimismo, posee la capacidad de volver a reconstituirse de nuevo en una nueva molécula de ADN de cadena doble idéntica a la original. Este acontecimiento químico-biológico que ofrece la posibilidad de realizar estudios tanto de cinética de desnaturalización y renaturalización de ADN, como de *mapeado* o localización de secuencias sobre los genomas, fue descrito por Marmur y Lane a partir de estudios con DNA de *Diplococcus pneumoniae* en 1960. Estos científicos perseguían profundizar en el conocimiento de las funciones del ADN a través del conocimiento de sus características estructurales. Este descubrimiento principalmente contribuyó al impulso de otra serie de estudios paralelos centrados en la

complementariedad de secuencias. A partir de un razonamiento en apariencia sencillo, Hall y Spiegelman (1961) sentaron las bases de la hibridación de ácidos nucleicos. Intuyeron que para que dos cadenas de ADN desnaturalizadas volvieran a unirse, sería un requisito imprescindible que existiese una complementariedad *casi perfecta* de sus secuencias nucleotídicas de forma que “tenemos por tanto un posible método para detectar secuencias nucleotídicas complementarias”. Para demostrarlo estudiaron la hibridación de secuencias entre ARN y ADN del bacteriófago T2, marcados con isótopos radioactivos, y detectando el grado de complementariedad por cuantificado de densidad óptica. Mediante la hibridación de ARN ribosómico marcado radiactivamente sobre ADN de *Drosophila melanogaster*, Rittosa y Spiegelman (1965) demostraron que dicho ARN procedía de las *Regiones Organizadoras del Nucleolo* (NORs; Nucleolar Organizer Regions). Para ello emplearon individuos mutantes de *Drosophila melanogaster* con distintas cantidades de NORs, que les permitieron comprobar que la cantidad de densidad óptica observada como consecuencia de la hibridación resultante se correspondía proporcionalmente con el número de NORs. Este experimento podría haberse resuelto de forma visualmente más directa observando los resultados sobre preparaciones metafásicas. Pero no sería hasta 1969 cuando se realiza el primer experimento *in situ*; en él Gall y Pardue lograron hibridar ARN ribosómico marcado radiactivamente sobre ovocitos de *Xenopus laevis*, y obtener fotografías mostrando el lugar físico de hibridación de la sonda de ARNr. Casi inmediatamente, los mismos científicos publicaron la primera *Hibridación in situ* (ISH; *in situ* Hybridization) llevada a cabo empleando una sonda de ADN (también modificado radiactivamente) (Pardue y Gall, 1969).

El descubrimiento por parte de Caspersson y colaboradores (1968) de que ciertos colorantes (el primero fue la quinacrina) tenían la capacidad de crear bandas fluorescentes discretas en los cromosomas, supuso un importante revulsivo en el desarrollo de la citogenética ya que supuso la introducción de la que es la herramienta más característica: el microscopio de fluorescencia. El descubrimiento de los distintos bandeados: Q (Caspersson y col., 1968, 1972), G (Chaudhuri y col., 1971), R (Dutrillaux y Lejeune, 1971) y C (Hsu y Arrighi, 1971; Sumner, 1972) permitió en lo sucesivo asociar regiones cromosómicas con características morfológicas y precisar en la localización de alteraciones estructurales, así como correlacionarlas con enfermedades.

Pero los estudios de hibridación aún discurrían paralelos; en 1981 se localizaron los primeros genes mediante ISH sobre metafases. Para ello se empleó ADN humano clonado y marcado mediante radioactividad (Harper y Saunders, 1981; Malcolm y col., 1981; Gerhard y col., 1981). Este descubrimiento supondría el inicio una prolífica época de localización génica empleando marcado radioactivo, con los inconvenientes característicos de este tipo de método: largos tiempos de exposición y escasa precisión (además del riesgo intrínseco que entraña el uso de isótopos). Como se presentará a continuación, la sustitución de estos isótopos radiactivos por moléculas fluorescentes

que permitieron la misma resolución espacial y menores tiempos de hibridación, así como el desarrollo del microscopio de fluorescencia, supusieron un gran avance en el perfeccionamiento de la técnica y permitieron su implementación como herramienta habitual en la investigación biomédica.

## **2.7 Hibridación in situ Fluorescente (FISH), Hibridación Genómica Comparativa (CGH) e Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH)**

Hoy en día la Hibridación in situ Fluorescente (FISH) (Pinkel y col., 1986a, 1986b) es una técnica de uso muy extendido en citogenética que basa su funcionamiento en la desnaturalización del ADN y su finalidad es la localización morfológica de secuencias de ADN sobre cromosomas, células o tejidos. Este proceso ocurre mediante la unión por homología de secuencias de un *ADN problema* modificado de forma que pueda ser detectado mediante microscopía de fluorescencia, a un ADN desnaturalizado. Se parte de una secuencia aislada de *ADN problema* que se transforma en una *sonda de ADN*. Para ello el primer paso es “etiquetar” o marcar esta secuencia de *ADN problema* utilizando nucleótidos modificados. Básicamente, se procede a la sustitución de algunos nucleótidos de la secuencia original por el mismo nucleótido modificado, de modo que al final de proceso la molécula de ADN resultante haya incorporado bien sea una molécula fluorescente o fluorocromo (FISH directa), o una molécula susceptible de unirse a un anticuerpo que llevará una molécula fluorescente o fluorocromo (FISH indirecta). De esta manera se obtiene una molécula de ADN modificada que se denomina *sonda de ADN*. Dicha *sonda* se desnaturaliza y se deposita sobre una preparación que contenga cromosomas, células o tejidos cuyo material genético se habrá desnaturalizado y estabilizado, generando ADN de cadena sencilla. Durante este proceso la *sonda* hibridará en las regiones de la cromatina donde se localice su secuencia de ADN homóloga. La visualización y localización física sobre el cromosoma de la secuencia marcada se produce mediante la excitación del fluorocromo presente en la sonda, empleando microscopía de fluorescencia. En este proceso se pueden introducir variaciones que permitan la localización simultánea de varias secuencias marcadas con fluorocromos que se revelen en distintos colores, u otro tipo de modificaciones como las descritas a continuación.

La FISH es una técnica de uso muy extendido que en 2001 se estimaba que ya había generado más de 10000 publicaciones (revisión en Kjeldsen y Kølvrå, 2001), pero quizá más llamativo aún es el hecho de la gran cantidad de variantes, que emplean misma lógica de hibridación por homología, que ha generado. Algunas de estas técnicas han supuesto avances revolucionarios en el campo de la investigación, como el *marcado de cromosomas completos* (whole chromosome painting) (Cremer y col., 1988; Pinkel y col., 1988b), el *marcado de cromosomas inverso* (reverse chromosome painting) (Carter y col., 1992), la *FISH multicolor* (Nederlof y col., 1990), la *Hibridación Genómica*

*Comparativa* (CGH; Comparative Genomic Hybridization) (Kallioniemi y col., 1992), o el *Cariotipado Espectral* (SKY; Spectral Karyotyping) (Schrönck y col., 1996). Además han surgido muchas otras técnicas de aplicación más diversa y específica, pero no por ello menos interesantes, ya que la mayoría proceden del impulso de genetistas y patólogos que tienen la necesidad de caracterizar genotípicamente síndromes y enfermedades, y encuentran en la localización morfológica de secuencias la herramienta idónea. En este ámbito aparecen técnicas como la *FISH de Péptidos-Ácidos Nucleicos* (PNA-FISH; Peptide Nucleic Acids-FISH) (Lansdorp y col., 1996), la *FISH de Orientación Cromosómica* (CO-FISH; Chromosome Orientation-FISH) (Goodwin y Meyne, 1993), la *FISH combinada con digestión por Nucleasas* (NU-FISH; Nuclease digestion-FISH) (Fernández y col., 1997), *Detección de Roturas en el ADN mediante FISH* (DBD-FISH; DNA Breakage Detection-FISH) (Fernández y col., 1998), etc. Y también la descrita en la presente memoria: la *Hibridación Genómica Comparativa-Completa* (W-CGH; Whole-Comparative Genomic Hybridization) (Pita y col., 2003).

La W-CGH es una técnica que surge como modificación de la CGH, que, como se ha dicho, es una variante de la FISH con una utilidad completamente diferente pero también basada en la hibridación de sondas en sus regiones de homología. Mediante la W-CGH se pretende localizar secuencias que, o bien son distintas, o están representadas con distinto número de copias en los genomas de los dos individuos que se comparan. Para ello la W-CGH requiere el empleo de dos genomas completos de los dos individuos a estudiar, marcados de forma independiente con distintas moléculas de modo que puedan ser reveladas con fluorocromos distintos. Se mezclan cantidades exactas de los dos genomas marcados para provocar un estado de competición estequiométrica entre ellos, creándose así la sonda que contiene ambos genomas en competición marcados de forma diferencial y llamada *Sonda Híbrida* (SH). Siguiendo un protocolo prácticamente idéntico al de la FISH, dicha SH se deposita sobre una preparación que contiene células fijadas y desnaturalizadas (generalmente se requieren metafases) sobre las que se producirá una hibridación competitiva entre los dos genomas marcados en las regiones donde presenten homología. En aquellos *locus* de los cromosomas de la preparación donde los dos genomas que compiten presentan homología, cabe esperar una hibridación repartida equitativamente entre las secuencias homólogas de los dos genomas marcados, lo cual se pondría de manifiesto con una fluorescencia similar de los dos fluorocromos con los que están marcados. Pero si uno de los dos genomas marcados presenta, para una determinada secuencia, mayor homología o número de copias que el otro, su genoma (marcado) hibridará preferentemente, desplazando al otro genoma en ese *locus*. Al observar en el microscopio de fluorescencia la prevalencia del color del fluorocromo con el que se revela uno de los dos genomas, se pondrá de manifiesto la diferencia existente entre los genomas comparados en ese *locus* concreto. Esto ocurre frecuentemente en los ADNs repetidos, ya que, como hemos dicho, son altamente polimórficos. De este modo con un simple protocolo de hibridación se detectan todas las diferencias en número de copias

de las secuencias del genoma, al nivel de resolución de la técnica, entre los individuos estudiados (sean de la misma o distinta especies).

La técnica original (CGH) es una práctica habitual en medicina para la detección de secuencias duplicadas o delecionadas involucradas en diversos tipos de procesos oncológicos (ver revisiones en Forozan, 1997; Gebhart, 2004). Debido a su sencillez y efectividad la técnica no sólo tiene una aplicación muy extensa y eficaz, sino que bajo su misma lógica de planteamiento han surgido distintas modificaciones que permiten su aplicación sobre *arrays* (array-CGH; Pinkel y col., 1998a). De forma rutinaria y en su utilización de carácter diagnóstico, la CGH requiere bloquear las posibles hibridaciones de secuencias de ADN altamente repetidas mediante la adición de competidores sin marcar, ya que su objetivo es localizar diferencias entre un *genoma control* y un *genoma problema* en secuencias únicas (concretamente aquellas que se encuentran mutadas, y por tanto involucradas, en procesos oncológicos) (Kallioniemi y col., 1992). El protocolo de la W-CGH no contempla el citado bloqueo, ya que precisamente su objetivo primordial de estudio son las secuencias de ADNsat que forman los bloques de heterocromatina constitutiva.

En cualquier caso las características y limitaciones de la W-CGH son las mismas que las de la CGH entre las que cabe destacar un poder de resolución de 5 Mb (Speicher y Carter, 2005). Esto implica que las duplicaciones y deleciones menores no pueden ser detectadas mediante estas técnicas, y que las diferencias detectables tienen que ser considerables en tamaño, por eso las secuencias de ADN altamente repetidas son el objetivo idóneo de estudio ya permite poner de manifiesto en un solo experimento todas las diferencias cualitativas y/o cuantitativas, detectables con su resolución, entre los genomas de los dos individuos comparados.

### **3 OBJETIVOS**

El objetivo del presente trabajo de investigación se centró en el desarrollo de una técnica que permitiera mostrar las diferencias existentes en representación diferencial de las secuencias de ADN altamente repetido entre dos genomas que fueran de la misma o distinta especie. La técnica denominada Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) se basa en una modificación y adaptación de la hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) de ácidos nucleicos.

Con este fin se plantearon una serie de estudios que pudieran poner de manifiesto sus distintos ámbitos de utilidad así como su potencial resolutivo. Para ello se diseñaron experimentos que permitiesen caracterizar su capacidad de localizar semejanzas y diferencias entre genomas en cuanto a secuencias de ADN altamente repetidas, en distintos niveles de relaciones filogenéticas.

Se analizaron relaciones intra-específicas: entre individuos de la misma especie (hombre), así como entre individuos de la misma especie y distinta raza (cerdo doméstico); inter-específicas: entre individuos de distinta especie y el mismo género (entre roedores del género *Microtus* y entre saltamontes del género *Arcyptera*) y entre individuos del mismo orden pero de distinto género (entre primates). También se pretende evaluar la capacidad de esta técnica para generar resultados aplicables en biomedicina o de interés evolutivo y estructural, a partir de los polimorfismos detectados.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materiales**

Para llevar a cabo experimentos de Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) se requieren muestras de ADN genómico, procedentes de los individuos a comparar, para ser marcadas y conformar la Sonda Híbrida (SH). Así como preparaciones celulares con abundantes metafases para realizar los experimentos de W-CGH, FISH y Bandas-C.

#### *Materiales Homo sapiens*

ADN genómico extraído a partir de sangre periférica de *Homo sapiens* (hombre). Se emplearon muestras de cinco varones y cinco mujeres para los estudios de *caracterización de los polimorfismos*. Y de una mujer y un varón concretos (M y V, respectivamente) para estudios de *aplicación para la cuantificación del grado de quimerismo post-trasplante de médula ósea (TMO)*. Linfocitos de los mismos individuos fijados en *carnoy* (metanol:ácido acético; 3:1) extraídos a partir las mismas muestras de sangre periférica de *Homo sapiens*.

Donaciones de los doctores José Luis Fernández y Vicente Goyanes. Sección de Genética y Unidad de Investigación. Hospital materno-infantil Teresa Herrera, complejo hospitalario Juan Canalejo. A Coruña.

#### *Materiales Sus domesticus*

ADN genómico extraído a partir de sangre periférica de *Sus domesticus* (cerdo doméstico). Muestras de dos individuos (machos) de cada una de las siguientes tres razas: Duroc (DU), Ibérica (I) y Landrace/Large White (L). Linfocitos de los mismos seis individuos fijados en *carnoy*, extraídos a partir de las mismas muestras de sangre periférica de *Sus domesticus*.

Donaciones del Dr. Pedro García Casado. Departamento de Reproducción Animal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid.

#### *Materiales género Microtus*

ADN genómico de *Microtus cabrae* (CAB) y de *Microtus nivalis* (NIV) (roedores) extraído a partir de fragmentos de cola. Muestras de un individuo macho de

cada especie. Linfocitos de individuos de las mismas especies fijados en *carnoy*. Dos plásmidos con las secuencias MSAT-160 de CAB (MSAT-160-CAB) y NIV (MSAT-160-NIV), respectivamente. MSAT-160-CAB es un trímero de 480 pb clonado en un vector pUC-19 y MSAT-160-NIV es un monómero de 160 pb clonado en un vector pGEM-T, ambos con un tamaño total de 3,2 kb, la concentración de ambos es 200 ng/μl.

Donaciones del Dr. Manuel J. Acosta. Departamento de Biología Experimental. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

### ***Materiales género Arcyptera***

ADN genómico de *Arcyptera tornosi* y *Arcyptera fusca* (saltamontes) extraído a partir del cuerpo completo (excepto de las gónadas). Muestras de un macho de cada especie. Células goniales procedentes del aplastado de folículos de gónadas fijadas con etanol:ácido acético (3:1), obtenidas de individuos de las mismas especies.

Material recolectado.

### ***Materiales Homo sapiens, Pan troglodytes, Gorilla gorilla y Chlorocebus aethiops***

ADN genómico de *Pan troglodytes* (chimpancé), *Gorilla gorilla* (gorila) y *Chlorocebus aethiops* (mono verde) (sexo desconocido en todos los casos) obtenidos a partir de la colección de muestras de INPRIMAT. ADN genómico de *Homo sapiens* extraído a partir de sangre periférica. Muestras de una mujer y un varón concretos (M2 y V2), respectivamente. Linfocitos de V2 y M2 fijados en *carnoy* extraídos a partir de las mismas muestras de sangre periférica.

Donaciones particulares.

### ***Materiales de la localización y caracterización de Lugares Lábilis Alcalinos (LLA)***

ADN genómico de *Sus domesticus* (cerdo doméstico) extraído a partir de sangre periférica. Muestras de dos individuos (machos), uno de raza Ibérica y otro de raza Landrace/Large White. ADN genómico de *Ovis aries* (oveja) extraído a partir de muestras de sangre periférica. Muestras de dos individuos (machos), uno de raza Assaf y otro de raza Castellana. Linfocitos de los mismos individuos fijados en *carnoy* y extraídos a partir de las mismas muestras de sangre periférica. Linfocitos de los mismos individuos sin fijar e incluidos en microgeles de agarosa, extraídos a partir de las



mismas muestras de sangre periférica. Muestras frescas de semen de los mismos individuos sin fijar e incluidas en microgeles de agarosa.

Donaciones del Dr. Pedro García Casado. Departamento de Reproducción Animal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid. Y de OVIGÉN S.A. Zamora.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) e Hibridación in situ Fluorescente (FISH)

#### 4.2.1.1 Preparación de las células

En la mayoría de los experimentos descritos en la presente memoria, las hibridaciones se llevaron a cabo sobre linfocitos fijados en *carnoy* (metanol:ácido acético; 3:1). Sin embargo en otras ocasiones por requerimientos del material o del experimento planteado, se practicaron hibridaciones sobre células fijadas mediante nitrógeno líquido (género *Arcyptera*) o sobre células sin fijar incluidas en microgeles (experimentos de DBD-W-CGH y DBD-FISH).

(Ver listado de sondas y preparaciones empleadas en Anexo 1).

#### *Linfocitos extraídos a partir de sangre periférica y fijados en carnoy*

Para la preparación de extensiones de linfocitos (en los que aparezcan metafases e interfases) sobre los que llevar a cabo los experimentos de W-CGH, FISH (y también bandas-C), se extrae sangre fresca del individuo (o individuos) que será estudiado, y se preserva para su cultivo en un tubo con Heparina-Litio (para evitar la coagulación hasta su utilización). Con la mayor premura posible se añaden 500 µl de esta sangre a un tubo con 5 ml de medio de cultivo (RPMI 1640) (GIBCO) que también contiene 500 µl de suero fetal de carnero, 75 µl de buffer Hepes 1M, 75 µl de L-Glutamina, 100 µl de fitohemaglutinina y 75 µl de ampicilina (50 µg/µl) y se mantiene a 37°C durante 72 horas. Posteriormente se añaden 200 µl de colchicina (10 µg/µl) y se deja actuar a 37°C durante 45 minutos. Se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min y se procede a un choque hipotónico exponiendo el decantado a KCl (75 mM) a 37°C durante 15 min, tras lo cual se centrifuga y se fija el sobrenadante en *carnoy*. Las células se conservan a -20°C hasta su empleo. Para la preparación de extensiones de linfocitos, se deposita una gota sobre un portaobjetos limpio (previamente conservado en 210 ml de etanol, 110 ml de metanol y 150 ml de ácido acético) y se deja secar al aire aproximadamente 2 h. Se comprueba la calidad de la preparación empleando un microscopio óptico y contraste de

fases. Se aceptan preparaciones con material bien conservado y que además tengan un alto número de metafases.

*Linfocitos extraídos a partir de gónadas de saltamontes y fijados con etanol:ácido acético (3:1)*

Tras la recolección de los organismos se obtienen gónadas frescas y se fijan rápidamente en etanol:acético (3:1), de esta manera pueden conservarse (a -20°C) hasta su utilización. Para obtener preparaciones, se aplasta un folículo de la gónada sobre una gota de ácido acético (45%) en un portaobjetos, se coloca un cubreobjetos y sumerge durante 5 s en nitrógeno líquido e inmediatamente después se retira el cubreobjetos. Antes de emplearse, se comprueba la calidad de la preparación empleando un microscopio óptico y contraste de fases. Se aceptan preparaciones con material bien conservado y que además tengan un alto número de metafases.

*Linfocitos y espermatozoides sin fijar incluidos en microgeles*

Los linfocitos recién extraídos se centrifugan suavemente y el pellet se diluye en PBS 1X. Las muestras frescas de semen se diluyen también en PBS 1X. En ambos casos se busca una concentración aproximada de  $5 \cdot 10^6$  células/ml. Para realizar la inclusión en microgeles, se mezcla la resuspensión de las células en PBS 1X con agarosa de bajo punto de fusión al 0,7%, a 37°C. Se eyectan 15 µl de esta mezcla en un portaobjetos de cristal previamente recubierto de agarosa al 0,65% secada a 80°C. Se coloca un cubreobjetos (10 x 60 mm) sobre la muestra y se deja solidificar a 4°C. Después de unos minutos se retira el cubreobjetos y la muestra se puede procesar. Tanto los linfocitos como los espermatozoides de una misma especie se procesaron en un mismo portaobjetos en dos microgeles separados longitudinalmente.

*4.2.1.2 Preparación de la Sonda Híbrida (SH)*

Para llevar a cabo los experimentos de W-CGH se requiere el marcado independiente (pero en cantidades idénticas) de dos muestras de ADN genómico procedente de los genomas de los dos individuos que serán los comparados en la hibridación. Estos dos genomas marcados se mezclan en cantidades exactas dando lugar a una SH. La síntesis de esta SH es un paso crítico en los experimentos de W-CGH y requiere ser muy exigente con la calidad de los ADNs empleados, así como muy preciso en la exactitud de las cantidades marcadas de cada individuo para que los resultados

sean fiables y los genomas de los individuos puedan ser rigurosamente comparados en base a esta SH.

#### ***4.2.1.2.1 Obtención de ADN genómico***

En la mayoría de los experimentos descritos se obtuvo el ADN genómico a partir de muestras de sangre periférica. Con la excepción de los estudios relativos al género *Arcyptera*, en el que se emplearon cuerpos completos de saltamontes para su obtención.

##### ***Obtención de ADN genómico a partir de muestras de sangre periférica***

Tras la extracción de la sangre, ésta se conserva en tubos con EDTA (5-10 ml). El proceso de extracción de ADN se lleva a cabo con un kit comercial para el aislamiento de ADN a partir de sangre de mamíferos (Roche). El proceso consta de una sucesión de etapas de digestión de linfocitos y eritrocitos, y de retirada de proteínas. A continuación se precipita el ADN con etanol puro y se mantiene 12 h a -20° C. Posteriormente se lava el ADN con etanol [70% (vol/vol)] y se deja secar. Por último se resuspende en agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) y se conserva a 4°C.

##### ***Obtención de ADN genómico a partir de cuerpos de Arcyptera tornosi y Arcyptera fusca***

Para la extracción de ADN genómico de las dos especies del género *Arcyptera*, se homogenizan los cuerpos de individuos previamente congelados a -80°C utilizando nitrógeno líquido y se digieren con Proteinasa K (300 µg/ml) y SDS 2% a 37°C durante 12 h. A continuación se precipitan con NaCl 6M durante 30 min a 4°C y etanol puro durante 12 h a -20°C. Posteriormente se lava el ADN con etanol [70% (vol/vol)] y se deja secar. Por último se resuspende en agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) y se conserva a 4°C.

#### ***4.2.1.2.2 Marcado de los genomas***

Tras realizar la extracción del ADN genómico, se mide su concentración mediante un espectrofotómetro (GeneQuant II; Amersham Pharmacia Biotech) con el fin de poder marcar con exactitud cantidades equimolares de los dos genomas en estudio, así como para analizar su pureza. También se comprueba su integridad

mediante electroforesis en gel de agarosa (1%). A continuación se marcan o sintetizan los genomas modificados que constituirán la SH, para lo cual se marca 1 µg de cada ADN genómico mediante la técnica de Nick Translation (Nick Translation Kit; Roche). Con el fin de conseguir un marcado diferencial de los dos ADNs se utilizan dos moléculas trazadoras diferentes: digoxigenina-11-dUTP y biotina-14-dUTP (que posteriormente podrán ser reveladas en distintos colores). La reacción de Nick Translation se deja trabajar durante 90 min. A continuación se detiene con EDTA 2M, pH 8. Para obtener una hibridación uniforme e intensa, los tamaños de los fragmentos de las sondas sintetizadas deben oscilar entre 600 y 2000 pares de bases. Siempre es aconsejable comprobar el tamaño de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Una vez marcados, se mezclan ambos ADNs genómicos de modo que obtenemos una SH en la que ambos ADNs están representados en igual cantidad y cada uno se encuentra marcado con una molécula trazadora diferente. A continuación se precipita esta SH con LiCl 4M y etanol puro durante 12 h a -20° C. Después se lava con etanol [70% (vol/vol)] y se deja secar. Posteriormente se resuspende en *mezcla de hibridación* [Formamida 50% (vol/vol), Dextran Sulfato 10% (peso/vol), 2XSSC; pH 7] hasta obtener una SH de concentración final 20 ng/µl. Se conserva a -20°C. Antes de ser utilizada para hibridación, esta SH se desnaturaliza a 70°C durante 10 min y después se mantiene 5 min en hielo.

(Ver listado de sondas y preparaciones empleadas en Anexo 1).

#### 4.2.1.3 Hibridación

La hibridación es otro punto clave en el correcto desarrollo de los experimentos de W-CGH y FISH. Es imprescindible que se aplique una correcta desnaturalización de las células sobre las que se va a hibridar, de modo que no se degrade el material genético, pero que se genere ADN de cadena sencilla (ADNss) al que la sonda (previamente desnaturalizada) se hibridará por homología.

##### *Hibridación de las preparaciones fijadas con carnoy o etanol:ácido acético (3:1)*

Cada una de las preparaciones que serán hibridadas tanto mediante W-CGH como mediante FISH, se incuba con 100 µl de 2XSSC a 37°C durante 1 h en cámara húmeda y bajo un cubre de *parafilm* (American National Can) de 24 x 24 mm, de modo que cubra toda la región de interés. A continuación se retira dicho cubre y se deshidrata la preparación en una serie sucesiva de etanoles a distintas concentraciones [70%, 85% y 100% (vol/vol)] a -20°C (durante 5 min en cada uno) y posteriormente se deja secar al

aire. Después se desnaturaliza en Formamida al 70%/2XSSC a 70°C durante 2 min, y se deshidrata de nuevo en la misma serie de etanoles descrita. Posteriormente se aplica la sonda correspondiente (SH para experimentos de W-CGH y sondas comerciales para FISH), previamente desnaturalizada, sobre la preparación, se coloca bajo un cubreobjetos de cristal (de 24 x 24 mm) sellado con goma, y se deposita en cámara húmeda a 37°C, permitiendo la hibridación durante 12 h.

#### *Hibridación de las muestras sin fijar incluidas en microgeles*

El protocolo de las muestras sin fijar incluidas en microgeles varía con respecto al protocolo de hibridación estándar, ya que en este caso se pretende conservar la estructura de las células de modo que se puedan detectar daños y roturas que existiesen en éstas en su estado natural. El protocolo de esta variante de la técnica que permite la *Detección de Roturas en el ADN mediante W-CGH* (DBD-W-CGH) es una adaptación para SHs del de DBD-FISH (Fernández y col., 1998).

En primer lugar las células se someten a un proceso de lisis y retirado de proteínas. Para ello se incuban las preparaciones en una solución ligeramente básica que contiene Tris-HCl 0,4M, NaCl 2M, SDS al 1% (vol/vol) y DTT 0,4M; pH 7,5, a temperatura ambiente (TA) durante 25 min. Las preparaciones se incuban en posición horizontal para evitar la dispersión de la cromatina. Posteriormente los nucleoides resultantes se lavan en NaCl al 0,9% a TA durante 10 min. A continuación las células se someten a un proceso que genera ADNss. Para ello las preparaciones se incuban a TA durante 150 s en una solución de desenrollado (“unwinding”) que contiene: NaOH 0,03M, NaCl 1M. Tras neutralizar los preparados con Tris-HCl 0,4M; pH 7,5 durante 5 min, los nucleoides se lavan en TBE 1X durante 2 min. Después se deshidratan en una serie de etanoles a distintas concentraciones [(70%, 85% y 100% (vol/vol))] a -20°C durante 2 min en cada uno, y se dejan secar. Posteriormente se aplica la sonda correspondiente, previamente desnaturalizada, se coloca bajo un cubreobjetos de cristal (de 10 x 60 mm) y se deposita en cámara húmeda a 37°C, permitiendo la hibridación durante 12 h.

Este protocolo se aplicó tanto en los experimentos que emplean una sonda de ADN genómico total (DBD-FISH), como los que emplean una SH (DBD-W-CGH).

#### *4.2.1.4 Revelado de la hibridación*

En todos los casos, después de la hibridación la preparación se lava en formamida al 50%/2XSSC a 42°C durante 15 min en agitación (excepto donde se indique lo contrario), y a continuación en 2XSSC a 37°C durante 8 min, también en

agitación. Se añade un bloqueante de anticuerpos inespecíficos [BSA 10% (peso/vol), Tween20 20% (vol/vol), 2XSSC; pH 7] y se incuba bajo un cubre de *parafilm* a 37°C durante 5 min en cámara húmeda. Y posteriormente se revela la preparación. En el caso de la W-CGH se emplean dos anticuerpos que permiten revelar las dos moléculas trazadoras empleadas con fluorescencias distintas, es decir: la digoxigenina en verde (G) y la biotina en rojo (R). Estos anticuerpos son Fluorescein Anti-digoxigenin (G)/Avidin-Rhodamine (R) (Roche). En los experimentos de FISH en que sólo se pretenda revelar una sonda sencilla se utilizará uno sólo de estos mismos anticuerpos. Para el revelado se incuba la preparación durante 25 minutos a 37°C en cámara húmeda bajo un cubre de *parafilm* (24 x 24 mm) con los anticuerpos descritos. Finalmente se lava la preparación en 4T [Tween 20 0,1% (vol/vol), 4XSSC; pH 7] y se monta la preparación con *anti-fading* (Vectashield), y, opcionalmente, se contra-tiñe con DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol) (100ng/μl).

#### 4.2.1.5 *Análisis Digital de Imagen (DIA) de los resultados de W-CGH y FISH*

Una vez montadas, las preparaciones se estudian empleando un microscopio de fluorescencia y un sistema de captura y Análisis Digital de Imágenes (DIA). El equipo utilizado consiste en un microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Leitz DMRB) con objetivos de 20, 40, 65 y 100 aumentos, equipado con una cámara digital CCD (Leica Microsystems DFC 350 FX) acoplada a un equipo informático y con un sistema de filtros de fluorescencia R, G y azul (B) (Leica Microsystems; filtros Y3, I3 y A, respectivamente). Las imágenes se captan en *niveles de gris* en tres canales distintos (R, G y B) con un programa informático adaptado para la función (Leica Microsystems DC Viewer 200), y se almacenan en formato “.tif”. Cada canal puede ser fotografiado con una velocidad de captura distinta, pero, salvo excepciones, los canales R y G se toman a idénticas velocidad (si los resultados de las hibridaciones no lo permiten, se pueden tomar a distintas velocidades y después ajustar los niveles R o G en base a los resultados de un control). Dado que el canal B corresponde a la contratinción con DAPI y no está relacionado con la competición entre genomas, puede ser tomado a otra velocidad distinta sin afectar en modo alguno a los resultados del experimento.

La superposición de los canales R, G y B para formar la imagen definitiva, así como la sustracción del fondo y la normalización de los niveles de R y G (en los casos en que sea necesario), se lleva a cabo mediante el empleo del programa informático Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated).

Sobre las imágenes de W-CGHs adquiridas de y montadas, se realiza el DIA con los programas informáticos Visilog 5.1 (Noesis) y Leica QWin Pro 3.2.0 (Leica Microsystems). El primero nos permite realizar un perfil longitudinal de la cantidad relativa de niveles de R y G, a lo largo del cromosoma o cromosomas seleccionados

(Figs. 3h y 4b',c'). El segundo nos permite medir la magnitud de la señal de fluorescencia en las metafases y/o células en interfase que deseemos estudiar, así como en las áreas que nos interesen de cualquier imagen. Los valores se obtienen en cantidad de niveles de R, G y B (en valores desde 0 hasta 255) de las regiones de las imágenes seleccionadas o "detectadas" manual o automáticamente.

A partir de los valores obtenidos mediante estos programas informáticos se procede al análisis de los distintos resultados empleando el soporte informático Microsoft Excel (Microsoft). En los experimentos de W-CGH la fluorescencia en R y en G de una determinada región será proporcional a la cantidad de hibridación de cada uno de los genomas presentes en la SH. Por tanto es necesario realizar cálculos para establecer las hibridaciones relativas de cada uno de los genomas. Para ello se calculan distintos parámetros a partir de los valores cuantificados de R y G (y B, ocasionalmente).

Cuando los individuos comparados comparten idénticas familias de secuencias de ADN altamente repetidas y sólo difieren en la *abundancia relativa* de éstas, se estima la relación R/G (o G/R). Esta relación en una determinada región será indicativa de la hibridación relativa de uno y otro genoma de los presentes en la SH. Y, por tanto, indicativa de la diferencia entre estos en el número de copias de las secuencias de ADN altamente repetidas de una determinada región. Se puede elegir de forma indiferente el parámetro R/G o G/R (ver Anexo 2).

En otras circunstancias se calcula la relación R/B (o G/B). Se trata de casos en los que se quiere relativizar el tamaño de un genoma o de unas regiones concretas localizadas mediante W-CGH o FISH, con respecto al tamaño completo del genoma en B, procedente de la contratinción con DAPI. Como es el caso de los estudios de resultados de FISH en los que se quiere comparar el tamaño del satélite clásico III de los cromosomas 9-9' de dos individuos distintos. Para ello se calcula la relación G/B, en la que relaciona el tamaño de los bloques de heterocromatina (G) con el tamaño del genoma total (B), en cada uno de los individuos. También es el procedimiento empleado para el cálculo del tamaño de las regiones centroméricas de las especies de *Microtus* frente al total de su genoma (ver Anexo 2).

Cuando los individuos comparados presentan regiones en las que no poseen las mismas secuencias, es decir cuando las diferencias no son de *abundancia relativa*, sino de *composición de secuencia*, entonces existen dos posibilidades. Si la W-CGH no se lleva a cabo sobre el genoma de ninguno de los dos individuos comparados, se puede calcular, de nuevo, la relación G/R (o R/G). Por otro lado, si la W-CGH se realiza sobre células de uno de ellos se puede calcular la *Identidad Citogenética* (IC). Ésta se define como:  $IC=2R/(R+G)$  (si el genoma sobre el que se híbrida es de la misma especie que el marcado en G en la SH);  $IC=2G/(R+G)$  (si el genoma sobre el que se híbrida es de la misma especie que el marcado en R en la SH) (ver Anexo 2).

Tanto para todos estos cálculos, como para la estimación de las medias, desviaciones típicas (desvest) y estudios de validación estadística, se emplea el citado programa informático (Excel; Microsoft).

#### 4.2.2 *Bandas-C*

Para obtener el bandeo que permite la localización de las regiones de heterocromatina constitutiva en los cromosomas, las preparaciones, previamente fijadas en *carnoy* o etanol:ácido acético (3:1) y secadas al aire, se sumergen en una solución de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  al 5% (peso/vol) a 60°C durante 10 min. A continuación tras lavar profusamente en agua corriente, se mantienen en 2XSSC a 60°C durante 30 min. Después se lavan en agua corriente de nuevo y se tiñen con colorante Giemsa al 5% (peso/vol) durante 3 min, se vuelven a lavar con agua corriente y se dejan secar. Se aplica un cubreobjetos con una gota de líquido montante (Depex; Serva) y se observan al microscopio óptico.



## 5 **RESULTADOS**

### 5.1 *Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) intra-específica*

#### 5.1.1 *Homo sapiens*

##### 5.1.1.1 *Caracterización de los polimorfismos*

Tras un experimento de Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) entre genomas de dos individuos de la especie humana, se observa que no todos los cromosomas de la preparación presentan emisión fluorescente en la misma longitud de onda. Tanto sobre los cromosomas en metafase como sobre los núcleos en interfase aparece toda una gama de colores que se corresponden con la transición entre las emisiones fluorescentes en rojo (R) y en verde (G). Existe una clara preponderancia de los tonos amarillo-anaranjados que se relacionan con una superposición proporcionada de las emisiones de los fluorocromos (R + G) con los que se revelan los genomas marcados presentes en la Sonda Híbrida (SH). En las metafases se observa que los brazos cromosómicos (salvo excepciones) muestran fluorescencia amarillo-anaranjada procedente de la suma de R y G, mientras que algunas regiones de heterocromatina centromérica muestran una dominancia R o G destacable (Fig. 3a-b'). Además es en esas mismas regiones donde los resultados se observan con fluorescencias más intensas debido a la alta condensación que sufren las regiones de heterocromatina constitutiva (Fig. 3g-h).

La dominancia de la fluorescencia de uno de los dos canales (R o G) indica una hibridación mayor, en esa determinada región, del ADN genómico marcado para ser revelado en ese color. Y, por tanto, pone de manifiesto un mayor número de copias de dicha secuencia en el genoma de ese individuo concreto. En base a este razonamiento podemos intentar localizar las regiones más polimórficas mediante W-CGH, es decir, las que presentan las diferencias más notables o con mayor frecuencia entre individuos.

Tras un experimento de W-CGH todas las regiones centroméricas, así como el brazo largo del cromosoma Y, son susceptibles de mostrar fluctuaciones en los niveles de las fluorescencias R y G, así como predominancia de una de ellas. Esta situación es particularmente evidente en los cromosomas 1, 9, 16 e Y, y en toda la serie de cromosomas acrocéntricos (13, 14 y 15) (Fig. 3). Además, la resolución de la técnica nos permite observar si se presentan diferencias entre familias que forman un mismo bloque de heterocromatina. Es decir, en aquellos cromosomas que presentan distintas familias de secuencias de ADN altamente repetidas integradas en la misma región centromérica, es posible encontrar diferencias en los patrones de fluorescencia que presenta cada una de ellas. Particularmente notable es el caso del cromosoma 1, donde el satélite-alfa (región pericentromérica) y satélite clásico II (región paracentromérica) muestran frecuentemente distintas *abundancias relativas* claramente visibles, cuando se comparan dos individuos concretos (Fig. 3c, g-h).

Los resultados anteriormente descritos fueron obtenidos en una batería de experimentos de W-CGH empleando 10 individuos elegidos al azar. A partir de estos resultados se plantearon los experimentos siguientes, diseñados para demostrar que las variaciones en color que aparecen en la heterocromatina constitutiva de algunos cromosomas se deben al aporte diferencial de secuencias de ADN satélite por parte de los dos genomas marcados presentes en la SH. Es decir, son debidas a polimorfismos en el tamaño de los bloques de heterocromatina de los dos individuos comparados. También a continuación se propone una posible aplicación a la localización de este tipo de polimorfismo.

#### *5.1.1.2 Aplicación para la cuantificación del grado de quimerismo post-trasplante de médula ósea (post-TMO)*

El trasplante de precursores de médula ósea (TMO) es el procedimiento terapéutico que se administra con mayor frecuencia a enfermos de leucemia. Tras el TMO se genera en el organismo del receptor del trasplante (RC) un estado de quimerismo celular. Es decir, células procedentes, y por tanto con las características genéticas del donante (D), conviven con las del paciente o RC. La capacidad del sistema linfohematopoyético de D de restaurar una hematopoyesis sana en RC es crítica para el éxito del trasplante y para evitar la recaída de RC (Petz y col., 1987; Dubovsky y col., 1999). Por este motivo el estudio, seguimiento y cuantificación del grado de quimerismo celular (proporción de células de D y RC) existente en el organismo de R, es determinante para observar el progreso y la dinámica de la enfermedad, así como para evaluar rápidamente la necesidad de alternativas terapéuticas, detectar un posible rechazo al trasplante o una recidiva (Petz y col., 1987; Khan y col., 2004; Thiede y col., 2004; Bader y col., 2005).

Se planteó un experimento con objeto de comprobar la capacidad de la W-CGH para encontrar diferencias entre los genomas de dos individuos considerados como D y RC en un hipotético TMO. Es decir, se intentó valorar la eficacia de la técnica para encontrar marcadores cromosómicos que permitan diferenciar e identificar los genomas y células de D y RC cuando se encuentren mezcladas en una situación de quimerismo celular. Con este fin se localizaron dos individuos diferentes en cuanto al tamaño de los bloques heterocromatina constitutiva de los cromosomas 9-9' (caracterizado como uno de los más polimórficos). Por tanto se esperaba de los dos individuos que tuviesen distinto número de copias de las secuencias de ADN altamente repetidas que conforman dichos bloques (satélite clásico III). El estudio previo de los cariotipos mediante Bandas-C permitió seleccionar una mujer (M) que presentaba dos cromosomas 9-9' cuyos bloques de heterocromatina constitutiva eran notablemente mayores que los de un varón (V), escogido como individuo a comparar con ella. El hecho de que fuesen de

distinto sexo supone una ventaja adicional, ya que permite realizar controles empleando sondas específicas para los cromosomas sexuales.

Para llevar a cabo un análisis previo de la capacidad de la W-CGH para detectar marcadores que permitan hacer un seguimiento eficaz del grado de quimerismo post-TMO, se siguieron tres pasos. En primer lugar se comprobó la efectividad de la W-CGH a la hora de detectar diferencias entre individuos en el número de copias de secuencias de ADN altamente repetidas presentes en determinadas regiones de heterocromatina constitutiva (concretamente en este caso en la región centromérica de los cromosomas 9-9'). En segundo lugar se corroboró mediante Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) y Análisis Digital de Imágenes (DIA) que el marcador detectado era cuantitativamente diferente entre M y V, y se calculó un valor, o Código Celular (CC), que caracterizara a M y V (el tamaño de los bloques de heterocromatina de sus cromosomas 9-9'). Por último se crearon artificialmente distintas situaciones de quimerismo y se comprobó la capacidad de la metodología propuesta, que implica W-CGH/FISH/DIA, para cuantificar correctamente el grado de quimerismo celular.

#### *Polimorfismos en los bloques de heterocromatina de los cromosomas 9-9'*

En primer lugar se marcaron los ADNs genómicos de V y M y se combinaron en cantidades idénticas para crear una SH que nos permitiese comparar sus genomas mediante W-CGH. El ADN genómico de M fue marcado con digoxigenina para ser revelado en G (M-G), mientras que el ADN genómico de V se marcó con biotina y reveló en R (V-R). La SH: M-G/V-R, se hibridó sobre preparaciones de linfocitos de V que presentaban abundantes metafases. Se seleccionaron y fotografiaron 10 metafases y se analizaron los resultados mediante DIA. Las imágenes revelaron fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) a lo largo de los brazos de los cromosomas y en ciertas regiones centroméricas (Fig. 4). Sin embargo, ciertos cromosomas (concretamente el 1, 9, 15, 16 e Y) mostraron en sus bloques de heterocromatina una fluorescencia en la que predominan el R o el G (Fig. 4). Es destacable el caso concreto del cromosoma Y, en el que, al tratarse de un cromosoma sexual exclusivo del varón, todo el aporte de secuencias homólogas presente en la SH proviene del ADN genómico de V, y, por tanto, muestra una notable fluorescencia R en la hibridación (Fig. 4a, c-c'). El empleo de una SH inversa: M-R/V-G, sirvió como control de que los resultados observados eran consistentes, al mostrar en su hibridación fluorescencias inversas.

A pesar de que mediante W-CGH se revelaron distintos polimorfismos entre M y V, para el presente estudio centramos nuestra atención en la región centromérica de los cromosomas 9-9', ya que esta pareja mostraba las mayores diferencias en el estudio previo con Bandas-C y además muestra la descompensación más notable entre niveles de R y G (a favor del G) (Fig. 4a-b'). Los valores de G y R en las regiones

centroméricas de los cromosomas 9-9' (medidos en ambos cromosomas simultáneamente) fueron cuantificados en 10 imágenes y se calculó la proporción G/R, que ofrece un valor medio de 1,87 ( $\pm 0,09$ ) revelando una alta predominancia de G sobre R ( $> 1,25$ , valor empleado habitualmente como umbral en los estudios de CGH) (du Manoir y col., 1995). La interpretación de dicho resultado nos permite concluir que la hibridación de M-G es notablemente mayor que la de V-R en esa determinada región, y, por tanto, presumir que el genoma de M presenta una cantidad mayor de secuencias de ADN altamente repetidas conformando las regiones centroméricas de sus cromosomas 9-9' que el genoma de V.

### *Caracterización de los individuos mediante un "Código Celular" (CC)*

Con el fin de establecer una característica genómica que nos permitiera distinguir entre los dos individuos estudiados (M y V) en una situación de quimerismo, empleamos la diferencia localizada mediante W-CGH, es decir el distinto número de secuencias de ADN altamente repetidas que presentan M y V en la región centromérica de sus cromosomas 9-9'. Para ello asociamos un valor numérico con el tamaño estas regiones para cada individuo. Con este fin se realizaron independientemente dos experimentos de FISH, uno sobre preparaciones con linfocitos de V y otro sobre linfocitos de M. Para hibridar la región centromérica de los cromosomas 9-9' en ambos casos, se empleó una sonda comercial de su satélite clásico III revelada en G (Fig. 5). Se capturaron 50 imágenes de interfases de cada uno de los experimentos (sobre V y sobre M) y se procedió al DIA. Esto se hizo con el fin de i) comprobar mediante DIA si realmente si dichas regiones son diferentes en tamaño entre los dos individuos y por tanto en número de secuencias que las conforman, y ii) para establecer el CC. El CC se define como el tamaño relativo de los bloques de heterocromatina centromérica de un determinado par cromosómico frente al tamaño total del genoma. Para llevar a cabo este cálculo es necesario medir la fluorescencia emitida por la sonda específica en las regiones centroméricas de los cromosomas 9-9' (que será proporcional al tamaño de los bloques de heterocromatina de dicho cromosoma), y compararla con la fluorescencia B del genoma total (procedente de la contratinción con DAPI). Por tanto el CC de la región centromérica de los cromosomas 9-9' (9CC) se calcula como la cantidad de niveles de G medidos a partir de la fluorescencia de la sonda del satélite clásico III del cromosomas 9, frente a la cantidad de niveles de B procedentes de la fluorescencia de la contratinción del genoma completo con DAPI. La suma de los niveles de G de las regiones centroméricas de los cromosomas 9-9' y la suma de los niveles de B en el resto del genoma, se cuantificó en 50 células independientes de cada uno de los individuos. Y estos valores se emplearon para calcular la relación G/B en dichas 50 células en interfase, para cada uno de los individuos. Los valores que se obtienen de la relación G/B para M (9CC-M) se encuentran dentro del rango: 0,0018-0,0097 (media=0,00486;

desvest=0,00284), y los de V (9CC-V) dentro del rango: 0,0004-0,0019 (media=0,00126; desvest=0,00055). Aunque ambos intervalos solapan entre los valores 0,0018-0,0019, se comprobó que existen diferencias significativas entre sus medias ( $t$ -Student=6,8>2,03;  $\alpha$ =0,05) (ver Tabla 1).

### *Cuantificación del quimerismo (artificial) empleando el CC*

Se crearon artificialmente tres situaciones de quimerismo para evaluar la eficacia del método propuesto. Para ello se mezclaron linfocitos fijados en *carnoy* de M y V en distintas proporciones conocidas: 1:1, 2:1 y 3:1 (M1:V1, M2:V1, M3:V1, respectivamente), estudiadas en tres preparaciones distintas. Se adjudicó un origen a cada célula de las presentes en estas situaciones de quimerismo, empleando el CC previamente establecido que caracteriza a cada individuo (en este caso 9CC-V y 9CC-M). Para ello se llevó a cabo sobre las distintas preparaciones (M1:V1, M2:V1, M3:V1) una FISH sencilla empleando la misma sonda comercial (satélite clásico III del cromosoma 9) e idéntico protocolo al que se utilizó en la determinación del 9CC (Fig. 5). En cada preparación se estimó el valor de 9CC de 50 células escogidas al azar y los valores resultantes se compararon con los de 9CC-M y 9CC-V previamente obtenidos. De esta manera se adjudicaron cada una de las 50 células de cada preparación a un supuesto origen: M ó V (O-M y O-V, respectivamente; ver tabla 2). Aquellas células cuyo 9CC se encuentra dentro del intervalo de solapamiento de 9CC-M y 9CC-V ( $G/B=0.0018 - 0.0019$ ) no pudieron ser asignadas a ningún origen, por tanto no fueron consideradas (*Desc:* ver tabla 2). Teniendo en cuenta que empleábamos células de individuos de distinto sexo, el uso adicional de una sonda comercial específica para la detección de las secuencias del ADN satélite del cromosoma X nos proporcionó un control del origen de cada célula en base a los cromosomas sexuales (Fig. 5). Y nos permitió comprobar que la adjudicación a un determinado origen mediante 9CCs fue correcta en todas las células consideradas. Los experimentos fueron repetidos tres veces para cada situación de quimerismo (M1:V1, M2:V1, M3:V1). Los resultados observados se compararon con los resultados esperados para cada grado de quimerismo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos (ver Tabla 2).

#### *5.1.2 Sus domesticus*

El número cromosómico del cerdo (*Sus domesticus*) es  $2n=38$ , y se encuentran repartidos en un cariotipo bimodal con doce cromosomas metacéntricos, seis acrocéntricos y dos sexuales. La heterocromatina constitutiva en los autosomas aparece predominantemente en las regiones centroméricas de todos ellos (Schnedl y col., 1981;

Gustavsson, 1988). El experimento aquí descrito tiene la intención de localizar las diferencias existentes entre distintas razas de cerdo en sus secuencias de ADN altamente repetidas. Y para ello se comparan mediante W-CGH tres razas con tres orígenes distintos. Dos europeas: la raza híbrida Landrace/Largewhite y la raza Ibérica, y una raza norteamericana: Duroc.

Estos experimentos se llevaron a cabo empleando distintas SHs sintetizadas a partir de los ADNs genómicos de individuos (machos) de las distintas razas (que se compararon dos a dos). Estas SHs fueron hibridadas sobre linfocitos fijados en *carnoy* procedentes de los mismos individuos. Las tres razas se organizaron por parejas para ser estudiadas: Ibérica vs. Duroc, Ibérica vs. Landrace/Large White y Landrace/Large White vs. Duroc. Los resultados se muestran resumidos en la tabla 3.

Se sintetizaron distintas SHs para ser empleadas como controles. En éstas el ADN genómico de cada individuo fue marcado independientemente para ser revelado con dos fluorocromos distintos (independientemente en R y G), y dichas SHs fueron hibridadas sobre linfocitos del mismo individuo. Adicionalmente se compararon entre sí distintos individuos de la misma raza. En todos estos casos los resultados mostraron fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) a lo largo de todos los cromosomas (manifestando mayor intensidad en las regiones de heterocromatina) como consecuencia de la hibridación semejante de los distintos marcajes del genoma presentes en la SH.

### *Raza Ibérica vs. raza Duroc*

El genoma de un macho de raza Ibérica marcado para ser revelado en R (I-R), se comparó con el de un macho de raza Duroc marcado para ser revelado en verde (DU-G). La SH: I-R/DU-G, se hibridó tanto sobre linfocitos del individuo Ibérico como del Duroc, de forma independiente. En ambos casos en los brazos cromosómicos se observó fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) como consecuencia de la hibridación equimolar de ambos ADNs genómicos (I-R + DU-G) (Fig. 6a-a''). La fluorescencia en la heterocromatina centromérica de los cromosomas acrocéntricos resultó también amarillo-anaranjada (R + G) (Fig. 6a). Sin embargo los cromosomas metacéntricos mostraron fluorescencia predominante R en las regiones de heterocromatina centromérica (hibridación preferente de I-R) (Fig. 6a'). Las fluorescencias descritas para cada subgenoma resultan idénticas tanto si la SH se hibrida sobre linfocitos del individuo de raza Duroc o del de raza Ibérica. La contribución final de cada uno de los genomas marcados a la hibridación, se calculó como la relación de R frente a G, valores que se midieron en las regiones de interés, las de heterocromatina constitutiva. Para ello se cuantificaron los valores de fluorescencia R y G en todas las regiones centroméricas de todos los cromosomas de uno y otro subgenoma por separado (acrocéntrico y metacéntrico), en imágenes de cinco metafases de Ibérico. Y se calculó la relación R/G

para cada subgenoma. Los resultados obtenidos fueron los siguientes; en las regiones de heterocromatina centromérica del subgenoma acrocéntrico, R/G: media=0,918; desvest=0,020; y en las regiones de heterocromatina centromérica del subgenoma metacéntrico, R/G: media=1,556; desvest=0,014; mostrando diferencias significativas entre ambas ( $t$ -Student=8,475>2,306;  $\alpha=0,05$ ). Por tanto, se observa que en el subgenoma acrocéntrico la contribución de I-R y DU-G a la hibridación final es casi idéntica (0,998~1), mientras que en el subgenoma metacéntrico la contribución de I-R es mayor que la de DU-G (1,556). Se obtienen los mismos resultados tanto si la SH se hibrida sobre linfocitos del individuo Duroc o del de raza Ibérica, pero se evaluaron los resultados sobre raza Ibérica por mostrar metafases de mayor calidad en este caso concreto, y se sondearon los resultados en Duroc para corroborar que los valores numéricos también eran equiparables. Además se utilizó una SH inversa (I-G –Ibérica Verde-/DU-R -Duroc Rojo-) como control interno del experimento, los resultados obtenidos muestran una situación inversa en los patrones de fluorescencia de los cromosomas del subgenoma metacéntrico, que fluorescieron preferentemente en G (procedente de la mayor hibridación de I-G) (ver tabla 3), mientras que los brazos cromosómicos y las regiones centroméricas de los cromosomas acrocéntricos mostraron de nuevo fluorescencia amarillo-anaranjada.

#### *Raza Ibérica vs. raza Landrace/Large White*

El ADN genómico de un macho de raza Ibérica marcado para ser revelado en R (I-R), se comparó con el de un macho Landrace/Large White marcado para ser revelado en verde (L-G). La SH resultante: I-R/L-G, se hibridó tanto sobre linfocitos del individuo Ibérico como del Landrace/Large White. Los resultados mostraron una fluorescencia predominante R en las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas metacéntricos (Figs. 6b' y 7). Y en esas mismas regiones de los cromosomas acrocéntricos, así como en los brazos cromosómicos se observó fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) (Figs. 6b y 7). Los valores medios de la relación R/G fueron calculados de la misma manera descrita en el párrafo anterior a partir de imágenes de hibridaciones sobre cinco metafases de linfocitos de la raza Landrace/Large White. Los valores obtenidos en las regiones de heterocromatina centromérica del subgenoma acrocéntrico fueron: R/G: media=1,076; desvest=0,049; y en las regiones de heterocromatina centromérica del subgenoma metacéntrico: R/G: media=1,424; desvest=0,002; revelando diferencias estadísticamente significativas entre las medias de R/G en ambos subgenomas ( $t$ -Student=3,827>2,306;  $\alpha=0,05$ ), y demostrando que el genoma del individuo de la raza Ibérica posee mayor número de copias de las secuencias del subgenoma metacéntrico que el de Landrace/Large White.

Los mismos resultados se observan tanto si la SH se hibrida sobre linfocitos del individuo Landrace/Large White como sobre los del ejemplar de raza Ibérica, pero se

evaluaron los resultados sobre Landrace/Large White por mostrar metafases de mayor calidad en este caso, aunque se sondearon los resultados sobre Ibérica para corroborar que los valores numéricos eran equiparables. Además al usar la SH inversa (I-G – Ibérica Verde-/L-R –Landrace/Large White Rojo-) como control interno, se observa una inversión de los patrones de fluorescencia descritos (ver tabla 3).

#### *Raza Landrace/Large White vs. raza Duroc*

Por último se compararon las razas Landrace/Large White y Duroc, cuyos genomas marcados se revelaron en R y G, respectivamente (L-R/DU-G). De nuevo todos los brazos cromosómicos así como las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas del subgenoma acrocéntrico mostraron una fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) (Fig. 6c). Mientras que las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas del subgenoma metacéntrico mostraron una fluorescencia predominante R (de L-R) (Fig. 6c'). La proporción R/G fue estimada en imágenes de cinco metafases de Duroc y mostró los valores siguientes: en las regiones de heterocromatina centromérica del subgenoma acrocéntrico, R/G: media=1,054; desvest=0,010; y en las regiones de heterocromatina centromérica del subgenoma metacéntrico, R/G: media=1,395; desvest=0,107; mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $t$ -Student=2,435>2,306;  $\alpha=0,05$ ), y demostrando que el genoma de Landrace/Large White posee mayor número de copias de las secuencias del subgenoma metacéntrico que Duroc.

Como en los experimentos anteriores, los mismos resultados se observan tanto si SH se hibrida sobre linfocitos del individuo Landrace/Large White o de Duroc, aunque se eligió Duroc para el DIA por mostrar metafases de mayor calidad, aunque se sondearon los resultados sobre Landrace/Large White para corroborar que resultados eran equiparables. También se observó una hibridación predominante G (de L-G) cuando se usó una SH inversa (L-G – Landrace/Large White Verde-/DU-R –Duroc Rojo-) como control interno (ver tabla 3).

#### *El cromosoma Y*

El cromosoma X en *Sus domesticus* es un cromosoma metacéntrico mediano, mientras que el cromosoma Y es el metacéntrico más pequeño del complemento, y su brazo *q* es completamente heterocromático (Schnedl y col., 1981; Gustavsson, 1988). La respuesta del cromosoma X a los experimentos de W-CGH fue comparable a la del resto de los metacéntricos del complemento, y por tanto fue considerado como un cromosoma más de dicho subgenoma. Sin embargo, el cromosoma Y presentó



diferentes patrones de fluorescencia en los distintos experimentos (Figs. 6 y 7) y por tanto fue analizado independientemente.

Concretamente cuando se empleó la SH: I-R/L-G (o inversa) se revelaron dos regiones distintas en el bloque de heterocromatina del cromosoma Y (tanto sobre metafases de raza Landrace/Large White o Ibérica) (Figs. 6b'' y 7). Todo el bloque presentó abundante señal de hibridación, pero se distinguen dos subdominios cromosomales discretos. La región proximal muestra dominancia R (de I-R) mientras que la región distal fluoresce preferentemente en G (de L-G) (Figs. 6b'', 6d'' y 7). Debido a la imposibilidad de delimitar las regiones por el pequeño tamaño del área y la existencia de una región de solapamiento de las fluorescencias no fue posible practicar DIA para cuantificar la contribución de cada uno de los genomas marcados a la hibridación final. Por otro lado, las SHs: I-R/DU-G y L-R/DU-G (hibridadas sobre linfocitos de Duroc o Ibérica, y Landrace/Large White o Duroc, respectivamente) mostraron hibridación homogénea R a lo largo de todo el bloque de heterocromatina del cromosoma Y, sin mostrar ninguna diferenciación intra-cromosómica (Figs. 6a'', 6c'' y 6d'') (tabla 3).

## 5.2 W-CGH inter-específica

### 5.2.1 El género *Microtus*

Los roedores de las especies *Microtus cabrae* (CAB) y *Microtus nivalis* (NIV) se compararon con el fin de establecer similitudes y diferencias en la abundancia y composición de las secuencias de ADN altamente repetidas que forman los bloques de heterocromatina constitutiva de sus regiones centroméricas. Además analizó si la secuencia MSAT-160 descrita en las regiones centroméricas de CAB y NIV (y de otras especies del género *Microtus*) (Modi, 1993a; Modi y col., 2003) es la componente exclusiva o mayoritaria de dichas regiones de heterocromatina constitutiva. El número cromosómico de ambas especies es  $2n=54$ , y se ha observado que las distintas especies de este género muestran gran variabilidad en la cantidad heterocromatina constitutiva de las regiones centroméricas de sus cromosomas (Modi, 1993a). CAB es la especie del género *Microtus* que muestra los bloques de heterocromatina autosómica de mayor tamaño (Modi, 1993a). En cuanto a los cromosomas sexuales, mientras que en la mayoría de las especies de mamíferos y del género *Microtus* (como por ejemplo NIV) tan solo el cromosoma Y presenta un bloque de heterocromatina, en CAB tanto el cromosoma X como Y muestran un bloque de tamaño extraordinario (especialmente este último).

### 5.2.1.1 Localización de MSAT-160 en *Microtus cabreræ* y *Microtus nivalis* mediante FISH

A partir de las secuencias del satélite MSAT-160 de CAB y NIV clonadas en sendos vectores (pUC-19 y pGEM, respectivamente), se marcaron sondas (MSAT-160 de CAB en R: MSAT-CAB-R; y MSAT-160 de NIV en G: MSAT-NIV-G) que se hibridaron, independientemente, mediante FISH, sobre preparaciones que contenían linfocitos de CAB y NIV mezclados. Los resultados obtenidos bajo una astringencia estándar del 50% (formamida al 50%/2XSSC) muestran como MSAT-CAB-R hibrida exclusivamente sobre las regiones centroméricas de CAB (y no hibrida en los bloques de heterocromatina de los cromosomas sexuales, salvo en la región centromérica del cromosoma Y) (Fig. 8a) y MSAT-NIV-G muestra un comportamiento análogo en las mismas regiones de NIV, aunque su señal es menor y no muestra hibridación alguna en el cromosoma Y (Fig. 9a). En ningún caso se observa que la sonda MSAT-CAB-R hibride sobre las regiones centroméricas de los linfocitos de NIV, ni que MSAT-NIV-G haga lo propio sobre CAB (Figs. 8b y 9b). Tan sólo si se reducen las condiciones de astringencia radicalmente hasta un 30% (formamida al 30%/2XSSC), se observa una leve señal de MSAT-CAB-R sobre las regiones centroméricas de los linfocitos de NIV, y de forma análoga MSAT-NIV-G hibrida sutilmente sobre la heterocromatina constitutiva de CAB.

### 5.2.1.2 *Microtus cabreræ* vs. *Microtus nivalis*

Como primera aproximación al estudio de las semejanzas y diferencias entre las regiones de heterocromatina constitutiva de CAB y NIV, se compararon mediante W-CGH sus genomas. Para ello se marcó el ADN genómico de CAB de modo que pudiera ser revelado en R (CAB-R) y el de NIV en G (NIV-G) y, mezclándolos, se sintetizó la SH: CAB-R/NIV-G. Esta SH se hibridó independientemente sobre linfocitos de CAB (Fig. 10) y de NIV (Fig. 11). Y posteriormente sobre una mezcla de linfocitos de ambas especies (Figs. 12 y 13). En todos los casos los resultados mostraron como los brazos cromosómicos (y las regiones de eucromatina en las interfases) son hibridados de forma semejante por ambos genomas marcados (aunque siempre sutilmente más por el genoma que se corresponde con el genoma en la preparación), y muestran fluorescencia aproximadamente amarillo-anaranjada (R + G) (Figs. 10, 11, 12 y 13). De igual forma se observa como las regiones de heterocromatina (centrómeros y bloques de los cromosomas sexuales) de CAB son hibridados preponderantemente por CAB-R (Figs. 10, 12 y 13) y los de NIV por NIV-G (Figs. 11, 12 y 13), sin mostrar solapamiento alguno (Tabla 4). Empleando como control una SH inversa CAB-G/NIV-R se obtienen patrones inversos que confirman los resultados (Tabla 4).

Además el experimento nos permite observar que las regiones centroméricas de CAB son ligeramente mayores que las de NIV (Figs. 10, 11, 12 y 13). Este resultado se corroboró cuantificando las cantidades de fluorescencia de las regiones centroméricas de los autosomas de CAB (R) y NIV (G) con respecto a la del total de su genoma (B; procedente de la contra-tinción con DAPI). Para ello se cuantificaron mediante DIA las fluorescencias en cinco imágenes de interfases de cada una de las especies y se compararon las medias de las relaciones R/B (CAB) y G/B (NIV), revelando diferencias significativas: R/B (CAB): media= 0,8604; desvest= 0,0593. G/B (NIV): media= 0,1830; desvest= 0,043.  $t$ -student= 20,724 > 2,306;  $\alpha=0.05$ ; g.l.=8.

Con el fin de comprobar si las secuencias MSAT-160 de CAB y NIV son las constituyentes del total de la heterocromatina constitutiva presente en las regiones centroméricas de estas especies, se realizaron los experimentos siguientes.

Se hibridó la SH: CAB-R/NIV-G junto con la secuencia MSAT-CAB marcada para ser revelada en G (MSAT-CAB-G), sobre una preparación de linfocitos de CAB y NIV mezclados (Figs. 14, 15, 16 y 17). Como resultado, se observan las regiones de heterocromatina centromérica (de autosomas y cromosoma Y) de CAB con fluorescencias en R y G (aunque R destaca sobre G), y fluorescencia R en las regiones de heterocromatina de los cromosomas sexuales (Figs. 14 y 15). La fluorescencia en R (de CAB-R) que ocupa toda la región centromérica y solapa con la región de fluorescencia G (de MSAT-CAB-G) tan sólo en una fracción de esta heterocromatina (Figs. 14, 15 y 16). Por el contrario en las regiones de heterocromatina de las células de NIV tan sólo se observa fluorescencia G (procedente de NIV-G) (Figs. 16 y 17). Es decir la secuencia de MSAT-CAB-G está hibridando solamente una fracción de la heterocromatina centromérica de CAB (y no muestra hibridación en las células de NIV, como ya habíamos comprobado anteriormente) (Tabla 4).

A pesar de que la contribución de MSAT-CAB-G a la hibridación es claramente observable en CAB (Figs. 14, 15 y 16), se procedió al cuantificado de la relación R/G en las regiones centroméricas de CAB, con el fin de observar la magnitud de la aportación de fluorescencia G procedente de la sonda MSAT-CAB-G. Para ello se cuantificaron las fluorescencias en R (procedente de CAB-R) y de G (procedente de MSAT-CAB-G) en cuatro metafases de CAB. Asimismo se cuantificó la relación R/G en las mismas regiones de cuatro metafases de CAB del experimento llevado a cabo anteriormente exclusivamente con la SH: CAB-R/NIV-G. Y se compararon las medias de R/G en ambos experimentos. En este caso, y en los sucesivos, se cuantificaron los resultados sobre metafases en lugar de interfases para poder seleccionar específicamente las regiones de heterocromatina a medir. Empleando exclusivamente la SH: CAB-R/NIV-G, la relación R/G en las regiones centroméricas de CAB es un valor alto (media=6,813) ya que en estas regiones hibrida de forma claramente predominante

CAB-R. La hibridación adicional de MSAT-CAB-G en las regiones centroméricas, que muestra el presente experimento, disminuye la relación R/G (media=3,487) al introducir fluorescencia en G en las regiones centroméricas. La comparación de medias revela que existen diferencias estadísticamente significativas, es decir la aportación de fluorescencia G procedente de MSAT-CAB-G es patente. Sobre regiones centroméricas de CAB, R/G (CAB-R/NIV-G): media= 6,813; desvest= 0,444. R/G (CAB-R/NIV-G + MSAT-CAB-G): media=3,487; desvest= 0,301.  $t$ -student= 12,606 > 2,447;  $\alpha=0.05$ ; g.l.=6.

También se llevó a cabo el experimento CAB-R/NIV-G en presencia de la secuencia MSAT-CAB marcada para ser revelada en R (MSAT-CAB-R) (Fig. 18). En este caso se observó sobre los linfocitos de CAB exclusivamente fluorescencia R (suma de las hibridaciones de CAB-R y de MSAT-CAB-R) y sobre NIV exclusivamente fluorescencia G (procedente de NIV-G). Una vez más al no observarse hibridación en R sobre NIV, se comprueba que MSAT-CAB-R no hibrida sobre las regiones centroméricas de los cromosomas de esta especie (Fig. 18b-b') (Tabla 4).

De forma análoga a la descrita en el experimento inmediatamente anterior, la SH: CAB-R/NIV-G, en este caso junto con la secuencia MSAT-NIV marcada para ser revelada en R (MSAT-NIV-R), se hibridó sobre una preparación de linfocitos de CAB y NIV mezclados (Figs. 19, 20 y 21). Se observan las regiones de heterocromatina de CAB en R (de CAB-R) (Fig. 21) y las de NIV con una hibridación amarillo-anaranjado en la que co-existen las fluorescencias G (procedente de NIV-G) y R (procedente exclusivamente de MSAT-NIV-R; recordemos que CAB-R no mostraba señal de hibridación en las regiones centroméricas de NIV en ninguno de los experimentos anteriores) (Figs. 19 y 20). En este caso la señal de solapamiento es bastante alta, siendo el área hibridada por la sonda MSAT-NIV-R notable en relación a la región, hibridada por NIV-G (Figs. 19b-c' y 20b-c') (Tabla 4). También se observa que la cantidad de MSAT-NIV-R hibridada en las regiones de heterocromatina de los autosomas es ligeramente variable entre ellos. Una vez más, el bloque de heterocromatina del cromosoma Y no muestra hibridación en R (de MSAT-NIV-R) (Figs. 19 y 20).

Mediante DIA, se procedió al cuantificado de la relación G/R en las regiones centroméricas de NIV con el fin de estimar la contribución de la sonda MSAT-NIV a la hibridación de estas regiones centroméricas autosómicas. Para ello se cuantificaron las fluorescencias G (procedente de NIV-G) y R (procedente de MSAT-NIV-R) en cuatro metafases. Los resultados se compararon con los obtenidos anteriormente empleando exclusivamente la SH: CAB-G/NIV-R sobre cuatro metafases de NIV. La comparación de medias revela que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de G/R entre los dos experimentos, es decir la hibridación de MSAT-NIV sobre las regiones centroméricas de NIV es destacable. Empleando exclusivamente la SH: CAB-R/NIV-G, la relación G/R en las regiones centroméricas de NIV es un valor

alto (media=4,071) ya que en estas regiones hibrida de forma predominante NIV-G. La hibridación de MSAT-NIV-R junto con CAB-R/NIV-G del presente experimento, disminuye notablemente la relación G/R (media=1,332) al introducir la fluorescencia en R en las regiones centroméricas (Figs. 19 y 20). Sobre las regiones centroméricas de metafases de NIV, G/R (CAB-R/NIV-G): media= 4,071; desvest= 0,384. G/R (CAB-R/NIV-G + MSAT-NIV-R): media= 1,332; desvest= 0,050.  $t$ -student= 15,709 > 2,447;  $\alpha=0.05$ ; g.l.=6.

También se llevó a cabo el experimento CAB-R/NIV-G + MSAT-NIV-G (Fig. 22). En este caso, sobre los linfocitos de CAB se observaba exclusivamente fluorescencia R (procedente de CAB-R) y sobre las células de NIV exclusivamente fluorescencia G (suma de las hibridaciones de NIV-G y de MSAT-NIV-G). Una vez más al no haber hibridación en G sobre CAB, se comprueba que MSAT-NIV-G no hibrida sobre las regiones centroméricas de los cromosomas de esta especie (Fig. 22c-c') (Tabla 4).

Comparando los resultados de los distintos experimentos, se observa como ni en CAB ni en NIV la secuencia MSAT-160 supone la totalidad de las regiones de heterocromatina. En el genoma de NIV, los valores medios de G/R en las regiones centroméricas varían de 4,701 en ausencia de MSAT-NIV, a 1,332 cuando se añade la secuencia (marcada en R). En cuanto a CAB, muestra una variación de los valores medios de R/G de 6,813, en ausencia de MSAT-CAB, a 3,487 cuando esta secuencia se añade (marcada en G). Luego se puede deducir que la aportación de MSAT-NIV a las regiones centroméricas de NIV es considerablemente mayor que la de MSAT-CAB a la de CAB, aunque en ambos casos existen más familias constituyendo las regiones de heterocromatina centromérica.

### 5.2.2 El género *Arcyptera*

Se compararon mediante W-CGH los genomas de dos especies distintas de ortópteros del mismo género: *Arcyptera tornosi* (AT) y *Arcyptera fusca* (AF). El cariotipo de ambas especies consiste en 11 parejas de autosomas acrocéntricos: dos parejas de cromosomas largos ( $L_1$ ,  $L_2$ ), seis de medianos ( $M_3$ - $M_8$ ) y tres de pequeños ( $S_9$ - $S_{11}$ ); y una determinación cromosómica del sexo del tipo X0/XX, aunque en este estudio concreto se emplearon machos ( $2n=22 + X0$ ). Además AT y AF presentan heterocromatina constitutiva en las regiones centroméricas distales de todos los cromosomas y muestran idéntico cariotipo bajo Bandas-C (Gosálvez y col., 1981).

Los genomas de AT y AF se marcaron de modo que pudieran ser revelados con fluorocromos distintos (R y G), creándose las SHs: AT-G/AF-R y la inversa AT-R/AF-G (los resultados descritos corresponden al uso de la primera, excepto donde se indique lo contrario). Estas SHs se hibridaron sobre preparaciones tanto de AT como de AF, que

en este caso correspondían a fases meióticas obtenidas de folículos goniales de individuos de ambas especies. La señal fluorescente resultante en los brazos cromosómicos procede de la suma de la fluorescencia de ambos genomas marcados y se muestra en amarillo-anaranjado (R + G). Sin embargo en las regiones de heterocromatina (pericentromérica o proximal y paracentromérica o distal) se observaron señales discretas con predominancia de fluorescencia R o G dentro un mismo bloque de heterocromatina constitutiva (Fig. 23a-e). Cuando se empleó la SH: AT-G/AF-R, los bloques de heterocromatina mostraron dos regiones. La región proximal reveló predominancia R (de AF) mientras que la distal mostró fluorescencia G (de AT) (Fig. 23a, c-e). El uso de la SH inversa: AT-R/AF-G, empleada como control, dio lugar a los resultados inversos (Fig. 23b). Los mismos resultados se observaron hibridando tanto sobre AT como sobre AF, es decir el genoma de AF hibrida siempre de forma dominante las secuencias de la región proximal y el de AT las de la región distal (en los cromosomas en los que dichas regiones son claramente visibles). De modo que se revela la existencia de, al menos, dos secuencias de ADN altamente repetidas, presentes en los bloques de heterocromatina de los cromosomas de ambas especies, pero representadas con distintas *abundancias relativas* en los genomas de AT y AF. Denominamos CAT-1 a la familia localizada en la región proximal (más abundante en AT) y DAF-1 a familia de la región distal (con mayor presencia en AF).

En el presente experimento también se detectó de forma extraordinaria una región cromosómica particular (de eucromatina) en el cromosoma S9 que mostraba fluorescencia G (de AT) y que por tanto se deduce que está más representada en el genoma de AT, aunque está sin caracterizar (Fig. 23i).

Por otro lado, los distintos patrones de fluorescencia observados en la heterocromatina nos permitieron detectar distintos patrones de condensación meiótica entre las dos familias de ADNs repetidos detectadas (Fig. 23f-i). Durante la Profase temprana (Paquitene) donde la mayoría de los bivalentes pueden ser localizados, se observaron diferentes regiones heterocromáticas sin condensar reconocibles por su patrón de fluorescencia. Las dos familias de ADNs repetidos descritas (denominadas CAT-1 y DAF-1) muestran retraso en la condensación con respecto a la eucromatina (Fig. 23f). Este retraso en la condensación desaparece en etapas posteriores de la meiosis, donde se observaron ya condensadas mostrando dos señales precisas e independientes en R y G (Fig. 23c-e). Con el fin de detectar si las dos secuencias que forman los bloques de heterocromatina (familias CAT-1 y DAF-1) muestran el mismo ciclo de descondensación-condensación, se estudió el comportamiento concreto de estas secuencias en un par cromosómico (asumiendo que en todos los cromosomas ocurre de forma análoga). Se escogió el bivalente S9 (el de más grande de entre los autosomas menor tamaño: S<sub>9</sub>-S<sub>11</sub>). Los resultados, analizados sobre cromosomas de AT, nos permitieron observar como existe un leve desfase entre la condensación de las dos familias de ADNs repetidos observadas. La familia localizada en posición distal (en G)

se condensa más tempranamente que aquella localizada en la región proximal (en R) DAF-1 a lo largo de la Profase meiótica (ver secuencia en la Fig. 23f-i).

### 5.3 W-CGH inter-genérica

#### 5.3.1 *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla* y *Chlorocebus aethiops*

Se compararon mediante W-CGH los genomas de cuatro especies de primates con el fin de localizar y cuantificar las diferencias y semejanzas existentes entre sus cromosomas y los del hombre (*Homo sapiens*), con especial interés en las secuencias de ADN altamente repetidas.

Los resultados se obtuvieron empleando el genoma del hombre como referencia. Es decir, todos los experimentos se llevaron a cabo sobre linfocitos humanos, de un varón concreto (V2). Sobre estos linfocitos de V2 se compararon los distintos genomas de primates con el del hombre, mediante el empleo de las siguientes SHs:

- i) V2 revelado en G (V2-G) vs. V2 revelado en R (V2-R) (control): **V2-G/V2-R**
- ii) V2 revelado en G (V2-G) vs. Mujer (*Homo sapiens*) (M2) revelada en R (M2-R): **V2-G/M2-R**
- iii) V2 revelado en G (V2-G) vs. Chimpancé (*Pan troglodytes*) (CH) revelado en R (CH-R): **V2-G/CH-R**
- iv) V2 revelado en G (V2-G) vs. Gorila (*Gorilla gorilla*) (GO) revelado en R (GO-R): **V2-G/GO-R**
- v) V2 revelado en G (V2-G) vs. Mono Verde (*Chlorocebus aethiops*) (MV) revelado en R (MV-R): **V2-G/MV-R**

También se emplearon SHs en las que se compararon los genomas de dos Primates-no humanos entre sí, también hibridadas sobre linfocitos de V2. En estos casos se emplearon las siguientes SHs:

- i) CH revelado en R (CH-R) vs. GO revelado en G (GO-G): **CH-R/GO-G**
- ii) CH revelado en R (CH-R) vs. MV revelado en G (MV-G): **CH-R/MV-G**
- iii) GO revelado en R (GO-R) vs. MV revelado en G (MV-G): **GO-R/MV-G**

Los resultados descritos a continuación son los obtenidos con las SHs listadas. Sin embargo, en todos los casos, también se emplearon las SHs inversas como control de los resultados (ver Anexo 1 y Fig. 24).

Dado que el cariotipo que se empleó como referencia en todas las comparaciones entre primates es el del hombre (concretamente el de V2), se estableció un control en el que se comparó el genoma de V2 revelado en G con el de él mismo revelado en R (V2-G/V2-R) (Figs. 24a y 25). Otro control que se empleó fue comparar

el genoma de V2 con el de una mujer (M2) mediante la SH: V2-G/M2-R (Figs. 24b, 26 y 30). Las distintas utilidades de este control son i) comprobar el éxito de la metodología mediante la observación de hibridación diferencial en el cromosoma Y (Figs. 24b, 26 y 30a); y ii) cuantificar las semejanzas y diferencias existentes dentro de la especie humana para compararlas con las existentes entre el hombre y el resto de especies de primates estudiadas. Además la misma SH empleada para dicho control (V2-G/M2-R) se hibridó (de forma excepcional y generando así un tercer control) sobre linfocitos de M2 con el fin de comprobar si el origen de los linfocitos empleados en la hibridación resultaba determinante en los resultados del experimento (Fig. 30b). En este punto cabe también aclarar que el sexo de los primates empleados en este estudio es desconocido (excepto el de V2 y M2), y por tanto se ha obviado cualquier resultado derivado de la observación de los cromosomas sexuales en el resto de las comparaciones entre primates.

#### 5.3.1.1 Resultados cualitativos

##### *Homo sapiens vs. Pan troglodytes, Gorilla gorilla y Chlorocebus aethiops*

Cuando se comparó el genoma de V2 (marcado para ser revelado en G) con el de él mismo (en R) mediante la SH: V2-G/V2-R, hibridada sobre linfocitos de V2, se observó fluorescencia amarillo-anaranjada (suma de R + G) a lo largo de los brazos (Fig. 24a; oculta bajo el DAPI en las imágenes RGB). Igualmente apareció fluorescencia amarillo-anaranjada en las regiones de heterocromatina centromérica, con la diferencia de que en éstas apareció más acentuada debido a la mayor condensación que presentan (Figs. 24a, 25 y 31a).

Cuando el genoma de V2 (marcado para ser revelado en G) se comparó con el genoma de M2 (en R) mediante la SH: V2-G/M2-R, se observó una situación que, en líneas generales, es semejante a la inmediatamente anterior pero con ciertas diferencias puntuales destacables. También en este caso los brazos cromosómicos mostraron fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) (Figs. 24b, 26, 30 y 31b), sin embargo en ciertas regiones centroméricas se presentó un patrón de fluorescencia desplazado hacia el G o el R (Figs. 24b, 26 y 30). Es el caso de los bloques de heterocromatina del cromosoma 16, que mostraron fluorescencia G (de V2) levemente predominante, mientras que el cromosoma 9 mostró fluorescencia preponderantemente en R (de M2) (Figs. 26 y 30). Es decir, las secuencias de ADN altamente repetidas del cromosoma 16 están representadas con un mayor número de copias en V2, mientras que las del cromosoma 9 lo están en M2. En el caso concreto del cromosoma 1, en el que conviven dos familias distintas de secuencias (satélite-alfa y satélite clásico II), se da la circunstancia de que la primera familia está más representada en el genoma de V2 (en G), mientras que la segunda en M2 (en R) (Fig. 31b). Por supuesto el caso más



llamativo cuando se comparan M2 y V2 es el del cromosoma Y (Fig. 26 y 30a), que es uno de los controles en este experimento concreto, y que mostró una notable fluorescencia G (procedente de V2-G), ya que el genoma de M2 no posee cromosoma Y. En el resto de los cromosomas los bloques de heterocromatina mostraron una tendencia hacia la fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) (Figs. 24, 26 y 30).

Cuando el genoma de V2 (marcado para ser revelado en G) se comparó con el de CH (en R) mediante la SH: V2-G/CH-R, se observó fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) en los brazos cromosómicos (Figs. 24c, 27 y 31c). Sin embargo, en las regiones de heterocromatina centromérica la hibridación observada es predominantemente G (de V2). Ocurre así en las regiones centroméricas de todos los cromosomas del complemento (Figs. 24c y 27). Sin embargo, si se elimina el canal del color G para poder observar la hibridación del Chimpancé en R, se observa una pequeña señal de hibridación en R en la región pericentromérica del cromosoma 1 (Figs. 27b y 31c) coincidiendo con la región del satélite-alfa.

Cuando el genoma de V2 (marcado para ser revelado en G) se comparó con el del GO (en R) mediante la SH: V2-G/GO-R, el resultado muestra una señal de hibridación semejante de ambos genomas marcados (R + G) en los brazos cromosómicos (Figs. 24d, 28 y 31d). Las regiones de heterocromatina centromérica mostraron exclusivamente fluorescencia G (de V2) (Figs. 24d y 28). Sin embargo existe una llamativa excepción en el cromosoma 9, en el que, a pesar de ser más abundante la fluorescencia G (de V2), se observa una clara señal de fluorescencia R (procedente de GO-R) (Figs. 24d y 28b'). Es el único cromosoma que muestra una respuesta semejante en este caso.

Cuando el genoma de V2 (marcado para ser revelado en G) se comparó con el del MV (en R), el único de los primates no-hominidos estudiado, mediante la SH: V2-G/MV-R, la situación se extremó con respecto a los resultados anteriores. Aunque los brazos cromosómicos mostraron una generalizada fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G), se observa que existe un leve desplazamiento hacia el G en todos ellos (Figs. 24e, 29b'-c' y 31e). Además en este caso todos los bloques de heterocromatina fluorescieron completamente en G y no existe ninguna señal de fluorescencia en R en ninguno de ellos (Fig. 29).

### *Pan troglodytes, Gorilla gorilla y Chlorocebus aethiops*

Aparte de los experimentos descritos en los que se compararon genomas de diversos primates con el del hombre, se realizaron otra serie de experimentos en los que se comparaban entre sí especies de primates-no humanos. Para ello se hibridaron distintas SHs sobre linfocitos humanos (de V2). La finalidad de esta serie de

hibridaciones fue comparar la afinidad de los genomas representados en cada SH por los cromosomas humanos.

Al comparar el genoma de CH (marcado para ser revelado en R) con el del GO (en G), mediante la SH: CH-R/GO-G, se observó hibridación de los dos genomas presentes en la SH (R + G) en los brazos cromosómicos pero con una notable prevalencia de la fluorescencia R (de CH-R) (Fig. 32b-c'). La mayoría de las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas humanos presentaron ausencia total de hibridación de cualquiera de los dos genomas presentes en la SH. Sin embargo el cromosoma 9, mostró una abundante señal de hibridación en G (de GO-G). También el cromosoma 1 mostró una leve señal, en este caso de fluorescencia R (de CH-R), en su región de heterocromatina percentromérica (Fig. 32).

Cuando se compararon los genomas de CH (marcado para ser revelado en R) y MV (en G) mediante la SH: CH-R/MV-G, se observó una hibridación homogénea amarillo-anaranjada (R + G) en los brazos cromosómicos, aunque se observa que existe un leve desplazamiento hacia el R (de CH-R) en todos ellos (Fig. 33b-c'). Sin embargo, la mayoría de las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas humanos presentaron ausencia total de hibridación de cualquiera de los dos genomas presentes en la SH (Fig. 33). Aunque los cromosomas 1 y 9 mostraron una leve señal, en este caso de fluorescencia predominante R (de CH-R), en su región de heterocromatina percentromérica (Fig. 33).

Finalmente cuando se compararon los genomas de GO (marcado para ser revelado en R) y MV (en G) mediante la SH: GO-R/MV-G, también se observó una hibridación homogénea amarillo-anaranjada (R + G) en los brazos cromosómicos, aunque se observa que existe un leve desplazamiento hacia el R (de GO-R) en todos ellos (Fig. 34b-c'). La mayoría de las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas humanos presentaron ausencia total de hibridación de cualquiera de los dos genomas presentes en la SH (Fig. 34), sin embargo, una vez más, la región centromérica del cromosoma 9 mostró una notable señal de fluorescencia R (de GO-R) (Fig. 34).

Estos resultados muestran la gran divergencia existente entre primates en sus secuencias de ADN altamente repetidas. La mayoría de estos polimorfismos son de *composición de secuencias*, con ciertas excepciones como las citadas y muy notablemente la del cromosoma 9 (entre V2 y GO), como se discutirá más adelante.

Alternativamente se planteó una posible aplicación adicional de la W-CGH como herramienta para cuantificar distancias genéticas entre dos genomas. Para ello se estudiaron las diferencias entre las distintas especies estudiadas y el hombre a nivel cuantitativo, como se describe a continuación.

### 5.3.1.2 Resultados Cuantitativos: Identidad Citogenética (IC)

Sobre los mismos experimentos descritos anteriormente en los que se comparaba el genoma del hombre con el de otros primates, se práctico el análisis cuantitativo de los resultados. Se emplearon las mismas SHs que fueron hibridadas sobre linfocitos de V2.

Se seleccionaron 15 linfocitos en interfase de cada experimento de W-CGH entre primates. En todos los casos las células escogidas presentaban las características ideales, es decir de tamaño medio-grande y sin falsa hibridación, ruido de anticuerpos o ninguna clase de fondo (Figs. 35 y 36). Estos linfocitos se fotografiaron por canales y se procedió al DIA en el que se cuantificaron las cantidades de fluorescencia G (procedente de V2-G) y R (procedente del genoma marcado del primate correspondiente en cada experimento). De este modo se determinó la contribución de cada una de los genomas marcados presentes en la SH a la hibridación final. También se cuantificó la señal en B procedente de la contratinción con DAPI para comprobar que los linfocitos eran equiparables en tamaño (datos no mostrados). A continuación se calculó el valor del parámetro: Identidad Citogenética (IC), que permite comparar la semejanza existente entre dos genomas a partir de resultados de W-CGH en base a la cantidad de fluorescencia R y G observada en la hibridación final (Fig. 37). Para el cálculo de la IC se emplea un genoma *referencia* que será el que corresponde a los linfocitos sobre los que se hibrida, V2 en nuestro caso, y dos genomas a comparar representados en la SH, uno de los cuales coincidirá con el genoma *referencia* (V2). La IC se define como la semejanza del genoma *referencia* con un segundo genoma o *invitado* (X) presente en la SH con el que compite por hibridar los *loci* de su propio genoma. Para ello asumimos que los genomas presentes en la SH (V2 y X) hibridan por igual en las regiones del genoma *referencia* en las que X muestre identidad de composición y abundancia de secuencias con V2. Mientras que en las regiones donde no existe dicha identidad de secuencias y el genoma *invitado* no muestre homología, hibridará exclusivamente el genoma *referencia* (V2 sobre V2). A partir de estas premisas se deduce la siguiente fórmula para calcular IC (cuando el genoma de referencia está marcado en G):

$$IC = 2R / (R+G)$$

Y, por tanto el valor inverso, es decir las No-Identidad Citogenética (NoIC), sería:

$$NoIC = (G-R) / (R+G)$$

(Si el genoma de *referencia* está marcado en R, se sustituye G por R, y R por G en ambas fórmulas)

Se calculó el valor de IC y de NoIC en cada una de las quince células fotografiadas en cada uno de los seis distintos experimentos de W-CGH realizados

comparando el genoma de V2 con el de diferentes primates (incluido compitiendo contra él mismo como control, y compitiendo contra el de M2 (que también en este caso se estudió hibridando excepcionalmente sobre linfocitos de M2). Se estimó una media y una desviación estándar de los quince valores obtenidos de IC y de NoIC (excepto algunos que se despreciaron por resultar no concordantes).

Los resultados obtenidos con experimentos de W-CGH sobre linfocitos de V2 (ver Tabla 5), mostraron como la comparación del genoma de V2 consigo mismo (V2-G/V2-R) revela una IC casi total ( $IC=0,9926$ ). Sin embargo cuando el genoma de V2, se comparó con el de M2, la IC se reduce considerablemente hasta 0,8579. Este valor es muy semejante al obtenido con la misma SH (V2-G/M2-R) sobre interfases de M2 ( $IC=0,8656$ ), y ambas medias no muestran diferencias significativas ( $t\text{-student}=0,5021 < 2,069$ ; g.l.=23). En el caso del CH y el GO, los valores de IC de estos individuos frente a V2 son muy semejantes entre sí ( $IC=0,7475$  e  $IC=0,7790$ , respectivamente). Son unos valores tan cercanos que si se repara en sus desviaciones típicas (Tabla 5) se puede observar que en ciertos casos puede existir solapamiento. Y por último el valor de IC más bajo es el que se obtuvo al comparar V2 con MV:  $IC=0,7056$ . Es destacable como, gracias a la correcta selección de los linfocitos a medir, las desviaciones típicas en todos los casos se encuentran en rangos de valores semejantes (Tabla 5).

#### **5.4 Aplicación de la W-CGH para la localización y caracterización de Lugares Lábil Alcalinos (LLA)**

Para estudiar la respuesta de la W-CGH sobre distintos tipos celulares y ante otro tipo de desnaturalizado y preparación celular, se llevó a cabo un experimento en el que se practicaba W-CGH sobre i) linfocitos fijados en *carnoy* (desnaturalizados con formamida, como en los casos anteriores), así como sobre linfocitos (ii) y espermatozoides (iii) incluidos en microgeles y sometidos a desnaturalización alcalina (DBD-W-CGH). Esta particular desnaturalización transforma las posibles roturas, naturales o provocadas, que presenta un determinado ADN, en ADN de cadena sencilla (ADNss). Estos ADN de cadena sencilla son susceptibles de ser hibridados en un entorno de W-CGH. Además, este tratamiento rompe los enlaces azúcar-fosfato en caso de encontrar dañadas las desoxirribosas, generando así también ADNss. Estas regiones del genoma se engloban en una denominación genérica conocida como Lugares Lábil Alcalinos (LLAs). Es decir, una hibridación tras un protocolo de DBD-W-CGH (con desnaturalización alcalina) pone de manifiesto tanto las roturas naturales del ADN, como los LLAs.

Con el fin de localizar y analizar las características de los LLAs, así como de evaluar la eficacia de la W-CGH ante distintos métodos de desnaturalización, se

realizaron una serie de experimentos sobre distintos tipos celulares de cerdo (*Sus domesticus*) y de oveja (*Ovis aries*).

#### 5.4.1 *Sus domesticus*

Como ya se ha dicho, el número cromosómico del cerdo es  $2n=38$ , repartidos en dos subgenomas, el metacéntrico con 12 pares de cromosomas y el acrocéntrico con 6 pares de cromosomas más dos cromosomas sexuales: un cromosoma X metacéntrico de tamaño medio y un pequeño cromosoma Y submetacéntrico (Scherf, 2000). Todas las regiones centroméricas presentan heterocromatina constitutiva. Este sistema se eligió ya que la discriminación que produce la W-CGH entre razas de cerdo en sus distintos subgenomas (ver apartado 4.1.2.), nos permitía analizar si existe una presencia diferencial de LLA entre estos subgenomas.

Previamente a los experimentos de W-CGH, se practicó un experimento de DBD-FISH (Fernández y col., 1998) sobre linfocitos y espermatozoides de cerdo incluidos en microgeles. Se empleó una sonda de ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcada para ser revelada en R. De esta manera este genoma modificado se hibridó sobre linfocitos y espermatozoides del mismo individuo incluidos en microgeles y desnaturalizados en álcali, de acuerdo con el protocolo de DBD-FISH. Los resultados muestran una abundante señal de hibridación de la sonda revelada en R sobre linfocitos (Fig. 38a), y una señal más leve en espermatozoides (Fig. 38b). Se repitió el experimento de forma análoga empleando ADN y células de un cerdo de raza Landrace/Large White obteniendo un resultado cualitativamente semejante.

De forma análoga a la realizada anteriormente (ver apartado 4.1.2.) se compararon mediante W-CGH los genomas de cerdos de la raza Ibérica y Landrace/Large White sobre linfocitos fijados en *carnoy* y desnaturalizados con formamida. Los brazos cromosómicos y las regiones de heterocromatina de los cromosomas acrocéntricos muestran fluorescencia amarillo-anaranjado (procedente de la suma de I-R + L-G) (Figs. 6b, 7 y 39a). Mientras que las regiones de heterocromatina del subgenoma metacéntrico muestran fluorescencia predominante en R (de I-R) (Figs. 6b', 7 y 39a-b). El cromosoma X presenta los mismos resultados que el resto de los cromosomas metacéntricos, mientras que el Y muestra dominancia en R (de I-R) en la región proximal y G (de L-G) en la región distal (Figs. 6b'', 7).

Cuando la misma SH se empleó sobre linfocitos y espermatozoides (de individuos de ambas razas) incluidos en microgeles y desnaturalizados en álcali, los resultados se mostraron netamente distintos. Los linfocitos mostraron abundante señal de fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) en determinadas regiones del linfocito (Fig. 39c). Sorprendentemente los espermatozoides apenas mostraron señal de hibridación y tan sólo se observa unas señales discretas de fluorescencia amarillo-

anaranjada (R + G) (Fig. 39c). En ninguno de los dos tipos celulares se observaron señales de fluorescencia exclusivamente en R o G. Los resultados fueron idénticos cuando se empleó una SH inversa (I-G/L-R).

#### 5.4.2 *Ovis aries*

El número cromosómico de la oveja es  $2n=54$ , repartidos en 23 pares de cromosomas acrocéntricos, 3 pares de metacéntricos y dos cromosomas sexuales: un cromosoma X acrocéntrico y pequeño cromosoma Y metacéntrico (Chapman y Bruere, 1977). También presenta heterocromatina constitutiva en todas las regiones centroméricas de sus cromosomas. Igual que en el caso inmediatamente anterior, en primer lugar se practicó un experimento de DBD-FISH sobre linfocitos y espermatozoides de oveja, incluidos en microgeles, empleando una sonda de ADN genómico total marcada para ser revelada en R. Se marcó el genoma de una oveja de raza Castellana (de origen español) y se hibridó sobre linfocitos y espermatozoides incluidos en microgeles del mismo individuo incluidos en microgeles, de acuerdo con el protocolo de DBD-FISH. Los resultados muestran señales de hibridación puntuales de la sonda en R sobre linfocitos (Fig. 38c), y más abundantes sobre espermatozoides (Fig. 38d). Se repitió el experimento de forma análoga empleando ADN y células de una oveja de raza Assaf (de origen israelí) obteniendo un resultado cualitativamente semejante.

A continuación, el genoma de un macho de raza Assaf marcado para ser revelado en R (AS-R) se comparó, mediante W-CGH, con el de un macho de raza Castellana marcado para ser revelado en G (CA-G). En primer lugar la SH: AS-R/CA-G, se hibridó, independientemente, tanto sobre linfocitos del individuo Assaf como del de raza Castellana desnaturalizados con formamida. En ambos casos, en los brazos cromosómicos se observó una fluorescencia amarillo-anaranjada procedente de la hibridación equimolar de ambos ADNs genómicos (AS-R + CA-G) (Fig. 39e-f). Sin embargo todas las regiones centroméricas de los cromosomas metacéntricos revelaban fluorescencia relativamente predominantemente en R (de AS-R) (Fig. 39e-f). Mientras que los cromosomas acrocéntricos mostraron fluorescencia predominante R (de AS-R) en la región proximal del bloque de heterocromatina centromérica, y fluorescencia G (de CA-G) en la región distal y los cromosomas sexuales se comportan de igual manera (Fig. 39e-f). Tanto si la SH se hibrida sobre metafases de linfocitos del individuo de raza Assaf o del de raza Castellana, se observan las fluorescencias descritas, probando que ambas razas poseen las mismas familias de ADNs repetidos en sus regiones centroméricas, y que las diferencias afectan sólo a la *abundancia relativa* de éstas. Además se empleó una SH inversa (AS-G/CA-R) como control, y los resultados obtenidos mostraron en los cromosomas metacéntricos y acrocéntricos un patrón inverso de fluorescencia del descrito, así como los brazos cromosómicos mostraron de

## Resultados 64

nuevo fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G), probando la fiabilidad de los resultados.

Cuando la misma SH se aplicó tanto sobre linfocitos como sobre espermatozoides (de individuos de ambas razas) que habían sufrido un proceso de desnaturalización en álcali, ambos mostraron señales adyacentes de fluorescencia en R y en G, siendo en los linfocitos discretas (Fig. 39g), mientras que las reveladas espermatozoide eran notablemente más abundantes e intensas (Fig. 39h).

## 6 DISCUSIÓN

Existen muy distintas motivaciones para promover el interés hacia el conocimiento tanto de las relaciones, como de las diferencias y semejanzas existentes entre especies. No sólo por razones taxonómicas o evolutivas, sino también para entender los diversos mecanismos moleculares, genéticos, citológicos, fisiológicos, ecológicos e incluso geológicos o ambientales implicados en los procesos que producen la diversidad de especies; así como para encontrar potenciales aplicaciones sociales, clínicas o del estudio y conservación de la biodiversidad.

Hoy en día, por encima del empleo de otras técnicas, abunda la proliferación de estudios de secuenciación de genomas completos enfocados a dar respuesta a todas estas, y otras, inquietudes. Existen un total de 2210 proyectos de secuenciación de genomas, de los cuales 470 han sido concluidos y publicados, (29 de *arqueas*, 397 de *procariotas* y 44 de *eucariotas*) (GOLD; Genome on-line Database. Última actualización del 10/12/06). Entre los genomas que se encuentran en proceso de secuenciación (1740), se encuentran los de organismos de todo tipo, desde virus, bacterias y hongos, hasta legumbres u organismos *modelo*. De hecho, aparte del genoma humano, algunos de los proyectos de secuenciación de mayor repercusión han sido el de *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre) (Adams y col., 2000) (y otras especies del mismo género) y el de *Mus musculus* (ratón) (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Y es que si se mira desde una perspectiva evolutiva, hay que rendirse ante la evidencia de que los genomas de todas las especies están altamente conservados, como no podía ser de otra manera dado que unas especies descienden de otras. Esta situación incluye la conservación de la homología de las secuencias, de la ordenación de genes (sintenia), de los grupos de ligamiento, o incluso de largos fragmentos cromosómicos (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002; Murphy y col., 2005). Por tanto, son muy diversos los tipos de marcadores que pueden emplearse para la caracterización de especies y/o genomas, más allá de la mera comparación de secuencias. A este nivel cabe destacar que las secuencias de ADN altamente repetidas que forman los bloques de heterocromatina son secuencias no-codificantes, y generalmente no se encuentran conservadas entre especies cercanas, es decir son susceptibles de mostrar un alto grado de divergencia (Samonte y col., 1997). Por esta razón consideramos que son marcadores ideales para encontrar diferencias entre especies cercanas evolutivamente y muestran un gran potencial en cuanto a sus posibilidades de uso en esa línea de trabajo.

Los resultados obtenidos mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) presentan esta técnica como una herramienta eficaz para localizar estas diferencias y semejanzas existentes entre genomas relacionados en sus secuencias de ADN altamente repetidas. Además es notable que la W-CGH nos permite sondear, no sólo polimorfismos entre individuos que pertenecen a la misma especie, sino también diferencias entre especies relacionadas evolutivamente. Como se ha visto, con esta



técnica, se pueden afrontar tanto estudios intra-específicos como inter-específicos e incluso intra-genéricos, siempre y cuando los individuos comparados sean suficientemente cercanos filogenéticamente para poder enfrentar sus genomas a una hibridación competitiva.

Es interesante resaltar el amplio espectro de aplicaciones que tiene la técnica, especialmente llamativo frente a su predecesora, la CGH, que está casi exclusivamente relegada a la detección de duplicaciones y deleciones en determinados procesos oncológicos mediante la comparación de un *genoma problema* con un *genoma control* (Kallioniemi y col., 1992; Speicher y col., 1993; Kallioniemi y col., 1994a; Kallioniemi y col., 1994b; Lichter y col., 2000; Speicher y Carter, 2005). Por el contrario, la W-CGH tiene una ambición completamente distinta, que es la localización de polimorfismos que afectan a las secuencias de ADN altamente repetidas que forman la heterocromatina constitutiva, regiones, como se ha dicho, altamente variables, hecho que incrementa las posibilidades de la técnica original de hallar diferencias entre genomas. Lo cual conduce a que los campos de aplicación de la técnica abarquen desde el análisis de relaciones filogenéticas entre especies, los estudios de grado de parentesco y la posibilidad de establecer hipótesis sobre mecanismos genéticos evolutivos y mecanismos estructurales, hasta aplicaciones potenciales en el campo de la medicina.

### **6.1 ¿Qué nos ayuda a resolver la Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH)?**

Cuando se comparan dos genomas de individuos de la misma especie (o de especies cercanas filogenéticamente) mediante W-CGH, la respuesta general es observar en los brazos cromosómicos una fluorescencia uniforme amarillo-anaranjada procedente de la suma de las emisiones roja (R) y verde (G), que además muestra menor intensidad que en las regiones heterocromáticas. Esto es debido a un aporte prácticamente equitativo de secuencias por parte de los dos individuos comparados (marcados para ser revelados en R y G, independientemente), puesto que las regiones de eucromatina de las especies cercanas filogenéticamente son generalmente muy parecidas bajo el prisma de la W-CGH. Y aunque puedan presentarse ciertas oscilaciones en los niveles de fluorescencia R o G de los brazos, en general éstas son debidas a artefactos como los procesos de apantallamiento de ciertos filtros, o los distintos tamaños de los fragmentos de las sondas para ciertos *loci*, factor limitante para el éxito del experimento. En cualquier caso, esas leves variaciones se consideran despreciables, ya que no se aproximan a valores significativos (Verma y Babu, 1995), y a efectos prácticos se considera que la hibridación de los genomas marcados de ambos individuos es homogénea en los brazos cromosómicos. Evidentemente este hecho es debido a la composición de la eucromatina de los brazos cromosómicos, que, por un lado, albergan los genes estructurales, que salvo en caso de mutación no se encuentran

diferencialmente duplicados o delecionados (y son el objetivo de la CGH), y también alojan otra serie de secuencias que, a pesar de no ser codificantes, tampoco presentan distintas *abundancias relativas* de suficiente magnitud entre individuos, como para ser detectadas mediante W-CGH (pseudogenes, intrones o incluso *ADNs dispersos*: LINEs, SINEs, LTRs...).

Sin embargo pueden aparecer variaciones en intensidad a lo largo de los brazos de cromosomas concretos, pero éstas son debidas a las propias características su eucromatina, sin que ello implique diferencias en la relación entre las fluorescencias R y G, como es el caso del cromosoma 19 humano que generalmente muestra una señal de hibridación aparentemente más intensa (Fig. 3b'). Este cromosoma se sabe que es el más rico en genes del genoma humano, y que muestra la mayor abundancia de pares de bases GC de todo el complemento (Grimwood y col., 2004). Este mismo hecho provoca que resalte más que el resto de los cromosomas, ya que cuando se lleva a cabo contratinción con DAPI es el cromosoma que aparece menos apantallado por este fluorocromo, que tiene gran afinidad por pares de bases AT.

Por el contrario en las regiones de centroméricas es donde se obtienen los resultados más rigurosos y esclarecedores al ser éstas susceptibles de presentar las diferencias más notables entre distintos genomas, debido a estar compuestas casi exclusivamente de secuencias de ADN satélite (ADNsat). Asimismo la mayor condensación que presenta la cromatina en estas regiones provoca que la fluorescencia sea más intensa y llamativa, lo cual facilita la determinación de los resultados (pudiendo provocar complicaciones en ciertos casos a la hora de la cuantificación, debido a los procesos de solapamiento de fluorescencias y de saturación del color).

Por tanto en la heterocromatina centromérica se puede observar que el rango de colores emitidos por el material genético de la preparación hibridada varía de forma continua dentro de los espectros del R y el G. De modo que la contribución relativa a la hibridación final de cada uno de los genomas marcados presentes en la Sonda Híbrida (SH) es susceptible de ser medida. Estas contribuciones relativas son estancas para cada pareja de genomas comparados, y abiertas y variables al comparar distintas parejas.

Como se ha dicho antes, la resolución de la W-CGH es de 5Mb (Speicher y Carter, 2005), es decir la técnica es capaz de detectar todas las diferencias entre dos individuos en número de copias de una determinada secuencia, mayores o iguales a dicho tamaño. Esto enmarca las limitaciones de la técnica, que no permite caracterizar fenómenos relacionados con poliploidías ya que las diferencias registrables no son de suficiente magnitud. Así como, obviamente, tampoco detecta inversiones ni translocaciones recíprocas, ya que la cantidad de ADN entre un individuo control y otro con una mutación estructural de dicho tipo se encuentran equilibradas. También por una cuestión de resolución el tipo de secuencias de ADN repetido en tándem que se detectan preferentemente, y casi exclusivamente, son las familias de ADNsat. Ya que estas secuencias son las que presentan mayor número de repeticiones y sucesiones de copias

más largas, y por tanto son susceptibles de formar polimorfismos de mayor magnitud. Los minisatélites son secuencias más variables pero menos repetitivas y son habitualmente consideradas mejores “huellas dactilares”, pero por presentar polimorfismos de menor tamaño quedan fuera del margen de detección de la W-CGH.

Cuando un experimento de W-CGH se practica entre genomas de individuos de la misma especie, las diferencias que se esperan encontrar son exclusivamente cuantitativas, es decir distintas *abundancias relativas*: variaciones en el número de copias de ADNsat de una determinada familia, en una o varias regiones centroméricas concretas. Este es el caso de los polimorfismos detectados en los experimentos de W-CGH intra-específica (*Homo sapiens* y *Sus domesticus*) y de las diferencias entre especies del género *Arcyptera*, así como en algunos cromosomas puntuales en los experimentos con primates, como se discutirá más adelante. Este tipo de variaciones en la *abundancia relativa* son muy frecuentes en los genomas eucariotas y en el genoma humano (Verma y Dosis, 1980) y en diversas ocasiones han permitido el diseño de aplicaciones médicas diversas (Hauge y col., 1975; Barker y col., 1977; Olson y col., 1986; John, 1988; Buño y col., 1999a). Sin embargo cuando se comparan individuos de distintas especies las diferencias genómicas localizadas mediante W-CGH pueden ser tanto de *abundancia relativa*, como de *composición de secuencias*; esto es diferencias entre las especies comparadas en las familias de ADNsat que componen una determinada región cromosómica o centromérica. Este último es el caso de los polimorfismos observados en los experimentos entre especies del género *Microtus* y la mayoría de los detectados entre primates.

Para determinar claramente el tipo de polimorfismo que nos revela la W-CGH, es de extrema importancia el correcto uso de los controles experimentales. En primer lugar es cabe aclarar que el origen de las células sobre las que se lleva a cabo la hibridación de la SH resulta (para casi todos los casos) indiferente o al menos no-determinante a la hora de establecer diferencias entre los genomas comparados. El único requisito imprescindible es que el material genético corresponda a alguna especie relativamente cercana de modo que pueda darse una hibridación consistente, aunque si procede de alguna de las especies comparadas el resultado será mucho más esclarecedor. En cualquier caso, este material sobre el que se hibrida ejerce tan sólo de “pantalla” donde se observan los resultados con mejor o peor calidad.

Esto implica que, en base a los resultados de un experimento de W-CGH, no se pueden obtener conclusiones sobre el tamaño de los bloques de heterocromatina de los genomas comparados, tan sólo de la *abundancia relativa* de secuencias que estos poseen. Esto es debido a que en la competición que se establece entre genomas participan el total de las secuencias de cada individuo, es decir las procedentes de ambos cromosomas homólogos. Por lo que se obtendrán los mismos resultados si la

aportación de un individuo procede de un par cromosómico con un bloque grande y otro pequeño, que de dos medianos con número neto de secuencias igual.

De forma semejante, el material genético sobre el que se lleva a cabo la hibridación puede presentar unos mayores o menores bloques de heterocromatina que mostraran con mayor o menor intensidad la fluorescencia, pero siempre la hibridación será proporcional a la aportación relativa de los genomas comparados mediante la SH, no al material genético de la preparación. Por ejemplo en el caso de la comparativa entre una mujer (M) y un varón (V) llevada a cabo en el experimento entre genomas humanos, el empleo de linfocitos de V aporta la ventaja adicional de permitir observar hibridación exclusivamente de V en el cromosoma Y del material genético de la preparación (Fig. 4a), es decir se trata de un control útil, pero los resultados en los otros cromosomas no cambian con respecto a lo que se habría obtenido sobre linfocitos de cualquier otro individuo de la misma especie con esa misma SH (Fig. 30). El único control imprescindible para otorgar credibilidad a los resultados obtenidos cuando se comparan dos individuos de la misma especie (X1 y X2, por ejemplo), es el empleo de SHs inversas. Es decir, los resultados obtenidos con una SH (X1-R/X2-G, por ejemplo) en cuanto a dominancia R o G en una determinada región, han de verse invertidos empleando la SH inversa (X1-G/X2-R). En este tipo de experimentos también puede resultar interesante hibridar tanto sobre material genético de X1 como de X2, aunque no sea indispensable. Si hibridando la SH: X1-R/X2-G, sobre X1, aparece una determinada región en R, indicará que dicha región está representada con mayor número de copias en el genoma de X1. Este hecho debe repetirse cuando la misma sonda se hibride sobre X2, es decir el genoma de X1 también debe desplazar al de X2 por hibridar esa misma región de X2. Porque al tratarse de individuos de la misma especie, el único polimorfismo esperable es de *abundancia relativa*, es decir de número de copias, de las que X1 tiene más que X2 en esa supuesta región.

El panorama cambia cuando se comparan dos individuos (X e Y, por ejemplo) entre los que existe la posibilidad adicional de detectar polimorfismos de *composición de secuencias*. En estos casos también es imprescindible el uso de una SH inversa como control interno del experimento. Y en segundo lugar, si se quiere comprobar si el polimorfismo es de *abundancia relativa* o bien de *composición de secuencias*, debe hibridarse la SH empleada sobre preparaciones de ambas especies. De modo que si hibridando la SH: X-R/Y-G, sobre X aparece una determinada región en R, y sobre material genético de Y esa región aparece en G, podemos concluir que lo que ocurre es que esos genomas son distintos entre sí para esa región concreta: existen diferencias en la *composición de secuencias*. También pueden practicarse diversas variantes de controles si se hibrida la SH sobre material genético que no pertenece a ninguna de las dos especies cuyo genoma está representado en la SH, como en los experimentos con primates.

De forma análoga a los controles, el Análisis Digital de Imágenes (DIA) se plantea de distinta manera dependiendo del caso que se estudie. Por ello en la presente memoria se han descrito dos tipos de estimaciones: la proporción R/G (o G/R) y la IC (Identidad Citogenética) (y NoIC). El primero se emplea cuando las diferencias entre genomas son de *abundancia relativa* y lo que se quiere es cuantificar la aportación proporcional de cada genoma de los presentes en la SH, por ello tan sólo se relativizan las cantidades de fluorescencia de uno y otro genoma entre sí en las regiones de interés. El IC por el contrario se emplea cuando existen diferencias en la *composición de secuencias*, y permite la estimación de *distancias citogenéticas*. Es decir cuantificar las diferencias globales incluyendo todo el genoma, incluso, obviamente, las secuencias de ADN altamente repetidas, hecho extremadamente novedoso.

Mientras que otras técnicas ensayan la búsqueda de un polimorfismo determinado que sirva para un fin concreto, la W-CGH pone de manifiesto todos los detectables en un solo experimento, aportando información comparativa sobre los mismos. Una técnica sencilla y extendida, y de uso temprano en diversos estudios y procesos como son las bandas-C, también es capaz de revelar el tamaño de los bloques de heterocromatina de un individuo, pero frente a ella, la W-CGH habla de tamaños relativos entre dos individuos e informa de la composición concreta de cada bloque. Aportando además información sobre las características de las diferencias encontradas (*abundancia relativa* o *composición de secuencias*) y, en ciertas circunstancias, revelando la existencia de distintas familias dentro de una misma región (como ocurre en el bloque de heterocromatina del cromosoma Y de *Sus domesticus* y en los de los autosomas de *Arcyptera tornosi* y *Arcyptera fusca*). Todas estas situaciones no hacen sino evidenciar que la W-CGH es una técnica joven, que mediante la presente memoria ha tratado de quedar caracterizada y acotada, pero cuyas virtudes y limitaciones aún pueden ser ampliadas gracias a su capacidad para ser ensayada en muy distintos contextos.

## 6.2 W-CGH intra-específica

### 6.2.1 *Homo sapiens*

Los 23 pares de cromosomas homólogos del complemento humano presentan heterocromatina centromérica constituida por diversas familias de ADNsat (Fig. 2). Los cromosomas 1, 9, 16 e Y son los que muestran bloques de heterocromatina de mayor tamaño (Craig-Holmes y col., 1973; Kalz y Schwanitz, 2004). Además, como se ha visto, estos cromosomas se encuentran entre los más polimórficos dentro del genoma humano (Craig-Holmes y col., 1973), aunque existe una cierta controversia al respecto. Ciertos autores no dudan en considerar que son las regiones de heterocromatina de los

cromosomas 15 y 22 las que permiten diferenciar mejor a dos personas tomadas al azar, y las de los cromosomas 3, 4 e Y las más deficientes para dicho propósito (Olson y col., 1986). Según otros estudios, los cromosomas cuyas regiones centroméricas son candidatas a ser las más polimórficas, son las de los cromosomas: 13, 3 y 22 (Kalz y Schwanitz, 2004) ó las de 13, 3 y 21 (Barrer y col., 1977). Lo que sin lugar a dudas es un hecho incontestable, es que existen abundantes regiones heterocromáticas susceptibles de mostrar polimorfismos de tamaño destacables, como son, además de las citadas, los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos: 13, 14, 15, 21 y 22, que no poseen ninguna región eucromática y están constituidos por diversas familias de ADNsat; así como los cromosomas 3 y 4 que también presentan regiones centroméricas de heterocromatina de un tamaño destacable. (Kalz y Schwanitz, 2004).

En lo que se refiere al tipo de secuencias cabría destacar que, bajo el estudio con W-CGH, en general, dentro de los bloques de heterocromatina centromérica, las regiones pericentroméricas (donde se encuentran el satélite satélite-alfa) presentan con mayor frecuencia un aporte semejante por parte de los dos genomas comparados que las regiones paracentroméricas (donde residen los ADNs satélites clásicos). Por tanto estos últimos son excelentes candidatos para la discriminación de genomas, concretamente los cromosomas 1 (satélite clásico II), 9 (satélite clásico III) y 16 (satélite clásico II). Estos datos sugieren que la variabilidad en las secuencias de satélite-alfa entre dos genomas humanos cualquiera es menor que la que se aprecia en los ADNs satélites clásicos, probablemente debido a una mayor presión selectiva derivada de la funcionalidad que se les atribuye a los primeros. Tanto en relación con actividades centroméricas (Jones, 1973; Willard y Wayne, 1987; Masumoto y col., 1989; Warbunton y col., 1993; Willard, 1998; Koch, 2000; Henikoff y col., 2001), como de directores en el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas durante la mitosis temprana (Brutlag y col., 1980; Bernard y col., 2001). A pesar de esto, la bibliografía revela la existencia de un discreto grado de polimorfismo en secuencias repetidas de satélite alfoide entre distintos individuos (Willard & Wayne, 1987, Alexandrov y col., 1988).

#### *6.2.1.1 La cuantificación del grado de quimerismo post-trasplante de médula ósea (post-TMO): un problema no resuelto*

Los resultados obtenidos mediante la combinación de W-CGH-FISH-DIA nos han permitido comprobar como esta secuencia de técnicas resulta eficaz a la hora de cuantificar el grado de quimerismo existente en un entorno creado de forma artificial. Sin duda la aplicación más interesante para este particular protocolo, que emplea polimorfismos en la heterocromatina constitutiva como característica para diferenciar las células de dos individuos concretos, se presenta en el ámbito de los trasplantes de precursores linfohemopoyéticos, llamado tradicionalmente trasplante de médula ósea (TMO) por ser ésta el precursor más característico.

Como se ha dicho, el TMO es el procedimiento terapéutico más habitual en pacientes con enfermedades congénitas o adquiridas que afectan a la médula ósea. Y es, por tanto, el tratamiento más frecuente que se aplica a enfermos de leucemia. Básicamente existen dos tipos de trasplante. En el conocido como trasplante autólogo, el Donante (D) y el Receptor (RC) son el mismo individuo. Por sus características, en este tipo de trasplante el seguimiento del proceso y el diagnóstico no están basados en la localización de marcadores que diferencien D y RC, por tanto escapa a la potencial aplicación de la W-CGH. Mientras que en el trasplante alogénico, el D es una persona distinta del RC. Tras el TMO alogénico se genera en el cuerpo de RC, lo que se denomina, inspirado en la mitología griega, una *quimera*. Es decir, células procedentes, y por tanto con las características genéticas, del D y del RC conviven en el organismo del RC. La capacidad del sistema linfohematopoyético del D de restaurar una hematopoyesis sana en el RC mediante la generación de una *quimera*, es crítica para el éxito del trasplante y evitar la recaída del RC (Petz y col., 1987; Dubovsky y col., 1999). Por ello el estudio, el seguimiento y la cuantificación del grado de quimerismo y de la enfermedad mínima residual (el número de células del RC que quedan después de la aplicación de una terapia) existente en el organismo del RC, son determinantes para observar el progreso y la dinámica de la enfermedad. Así como para detectar posibles rechazos al trasplante, recidivas, o bien para evaluar la necesidad de alternativas terapéuticas (Petz y col., 1987; Khan y col., 2004; Thiede y col., 2004; Bader y col., 2005). Hasta la fecha se han propuesto y descrito diversas metodologías para determinar el grado de quimerismo. Todas estas técnicas se basan en la localización de marcadores genéticos que permitan diferenciar las células del D y del RC. Entre las técnicas clásicas para evaluar el quimerismo se encuentran el fenotipado de eritrocitos (Sparkes y col., 1977; Bar y col., 1989), el análisis de isotipos de la inmunoglobulina (Witherspoon y col., 1978) y otros métodos citogenéticos convencionales (Lawler y col., 1984; Arthur y col., 1988; Ribeiro y col., 1996). El desarrollo de la biología molecular permitió plantear métodos alternativos y más precisos (Blazar y col., 1985; Min y col., 1988; Roth y col., 1990), de modo que una de las técnicas más extendidas hoy en día es la aplicación de la PCR para el estudio del *Número Variable de Repeticiones en Tandem/Repeticiones en Tandem Cortas* (VNTR/STR-PCR; Variable Number Tandem Repeats/Short Tandem Repeats) (Roth y col., 1990) que se considera una técnica muy eficiente a la hora de estudiar el quimerismo y que evalúa el grado de quimerismo en base a diferencias entre D y RC detectadas en estos marcadores altamente polimórficos (Lawler y col., 1991; Najfeld y col., 1997; Thiede y col., 1999; Thiede y col., 2004; Buño y col., 2005; McCann y col., 2005). Sin embargo el principal contratiempo de la mayoría de las técnicas es que simplemente proporcionan aproximaciones semi-cuantitativas del grado de quimerismo; es decir no cuentan físicamente el número de células del D y del RC presentes en el organismo del RC, y en el mejor de los casos lo extrapolan. Una técnica que no muestra dicha carencia es la Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) empleando sondas para detectar los cromosomas sexuales en las

células presentes en el RC (FISH-XY) (Durnam y col., 1989; Dewald y col., 1993; Antin y col., 2001; Buño y col., 2003; Buño y col., 2005), y es que la caracterización celular es un método de cuantificación en muchas ocasiones más certera y directa para estimar el grado de quimerismo celular tras TMO que otras metodologías de características exclusivamente moleculares (Elmaagacli y col., 2001). Aunque esta técnica presenta otros inconvenientes, el principal de los cuales es que, teniendo en cuenta que son los cromosomas sexuales los marcadores empleados para identificar las células de D y RC, la FISH-XY sólo es efectiva en casos de trasplantes entre individuos de distinto sexo, lo cual reduce significativamente su margen de aplicabilidad. La evaluación mediante *PCR cuantitativa* (RT-PCR; Reverse Transcriptase-PCR) también es considerada una técnica muy resolutive y de aplicación muy extendida (Roth y col., 1990; Thiede y col., 1999; Alizadeh y col., 2002). Sin embargo la localización de marcadores que permitan distinguir al D del RC es compleja, y retrasa y complica la aplicabilidad de la técnica (Bader y col., 1997). Semejante panorama pone en evidencia que aún no existe un acuerdo generalizado en cuanto a la técnica idónea (Alizadeh y col., 2002, Khan y col., 2004). Por tanto, la determinación del grado de quimerismo celular tras TMO es todavía un problema con variedad de formas de afrontarlo, pero sin una técnica absolutamente eficaz y resolutive para cuantificarlo (Khan y col., 2004; Thiede y col., 2004; Bader y col., 2005). El método propuesto a partir de los polimorfismos detectados mediante W-CGH, abre la posibilidad de usar marcadores distinguibles a nivel cromosómico, fácilmente cuantificables, para establecer el grado de quimerismo de forma análoga a la FISH-XY. Con la ventaja adicional de ser también aplicable en caso de trasplantes entre individuos del mismo sexo.

Los resultados presentados en esta memoria sustentan la idea de que la W-CGH combinada con FISH y DIA, puede ser una herramienta útil para determinar el origen de las células presentes en una situación de quimerismo celular. Esta metodología, como casi todas en este ámbito, requiere, en primer lugar, localizar mediante W-CGH los marcadores que distinguirán las células de D y RC tras el TMO. Es decir, identificar los cromosomas cuyas regiones centroméricas muestran diferencias en el número de copias de secuencias de ADN altamente repetidas entre los potenciales D y RC. Por ser altamente polimórficas, las regiones centroméricas son excelentes marcadores ya que es sumamente probable encontrar diferencias entre individuos cualesquiera, incluso entre parientes (Buño y col., 1999b). Este hecho es muy relevante dado que la mayoría de los trasplantes intentan llevarse a cabo entre familiares para disminuir la probabilidad de rechazos por reacciones inmunológicas, lo cual dificulta la localización de marcadores en la mayoría de las situaciones. En el ejemplo descrito en la presente memoria se selecciona como marcador para distinguir D y RC las regiones centroméricas de los cromosomas 9-9', por ser la que muestra diferencias más notables entre los genomas de la mujer (M) y el varón (V) estudiados (actuando como potenciales D y RC). Pero podrían haberse seleccionado otros marcadores que permitieran diferenciar sus genomas



(concretamente los cromosomas 1, 9, 15, 16 e Y, que muestran también diferencias entre M y V), o incluso más de un marcador simultáneamente. Esto habría aumentado la eficacia del estudio ya que se habría eliminado el problema del grado de solapamiento mostrado entre los Códigos Celulares (CCs), 9CC-M y 9CC-V, puesto que el empleo de un CC adicional procedente de otro polimorfismo habría permitido asignar un origen a aquellas células que recaían en el intervalo de solapamiento. Porque, aunque no todas las diferencias detectadas entre los genomas de M y V son suficientemente notables por si solas para ser susceptibles de establecer unos valores de CC que permitan diferenciar sus células, la capacidad de poder elegir amplia las posibilidades de éxito.

Tras la W-CGH, y una vez seleccionados los marcadores, se lleva a cabo una FISH empleando sondas comerciales de los marcadores. Esto permite comprobar las diferencias de tamaño entre los marcadores elegidos para diferenciar D y RC, así como también establecer los CCs que caracterizan los genomas, y por tanto las células, de D y RC. De modo que estos valores de CC pueden quedar establecidos de forma previa al trasplante a partir de muestras de sangre extraídas a los potenciales D y RC. En lo sucesivo la aplicación de este mismo protocolo de FISH (con las mismas sondas) y DIA en muestras obtenidas a partir de la sangre del RC (desde inmediatamente después del TMO), permitirá asignar un origen (D o RC) a cada célula en base al CC observado en ella, y realizar la cuantificación del grado de quimerismo de forma directa e inmediata. Además, los resultados pueden estudiarse perfectamente en interfase, posibilitando la valoración de un número alto de células, lo que permite un incremento de la consistencia de la valoración de la cuantificación del quimerismo realizada. Esta parte del protocolo se desarrolla de forma análoga al estudio del grado de quimerismo mediante FISH-XY, con la diferencia de que en ese caso los marcadores son exclusivamente los cromosomas sexuales y el estudio se encuentra limitado a trasplantes entre individuos del mismo sexo. A pesar de ello, la FISH-XY está considerada una de las técnicas más eficaces para la evaluación y cuantificación del grado de quimerismo post-TMO (Khan y col., 2004) y se estima que ofrece un margen de error tan sólo del 1% cuando se analizan 500 células (Buño y col., 2005). Pero sin duda la mayor ventaja del empleo de W-CGH es que elude la búsqueda específica de marcadores de forma previa al trasplante. Ésa es precisamente la parte más tediosa del proceso cuando se emplean otras técnicas, como la PCR cuantitativa, ya que requieren el ensayo arbitrario de potenciales candidatos a marcadores, mientras que la W-CGH revela todos los que sus características le permiten localizar en un solo experimento, y tan sólo exige seleccionar de entre ellos el, o los, mejores candidatos para distinguir D y RC.

En conclusión, la aplicación de FISH-DIA de marcadores detectados mediante W-CGH permite distinguir el origen de las células presentes en una situación de quimerismo artificial con una alta fiabilidad. El empleo de varios marcadores y el perfeccionamiento y aumento de precisión de las técnicas pueden facilitar tanto su

aplicabilidad como la automatización del proceso para su implementación en la evaluación del grado de quimerismo post-TMO.

### 6.2.2 *Sus domesticus*

Al comparar genomas de cerdo doméstico (*Sus domesticus*) mediante W-CGH, los resultados permiten poner de manifiesto una particular situación en el genoma de esta especie. Ya que se localizan, no sólo diferencias en la abundancia relativa de secuencias de ADN altamente repetidas entre los individuos y las razas estudiadas, sino también una dinámica concreta y distinta por parte de los ADNs repetidos de cada uno de los subgenomas del cerdo (acrocéntrico y metacéntrico).

El cerdo doméstico es una especie muy extendida que presenta aproximadamente unas 500 razas diferentes (Scherf, 2000). Charles Darwin (en 1868) describió dos líneas de cerdo doméstico: la europea (*Sus scrofa*) y la asiática (*Sus indicus*), y consideró que ambas descendían de distintas formas ancestrales. Por el contrario, hoy en día diversos estudios apuntan que todas las especies tuvieron su origen en los cerdos salvajes de la especie *Sus scrofa* que existieron a lo largo de Eurasia y el norte de África y a partir de los cuales se llevó a cabo una domesticación progresiva (Giuffra y col., 2000; Scherf, 2000). En cualquier caso la confusión del científico inglés invita a reflexionar sobre las dificultades que subyacen a la determinación del origen y el estudio de la expansión de la mayoría de las especies de cerdo doméstico, porque, entre otras cosas, la del cerdo es una historia compleja de cruzamientos y selección artificial. Si bien existen abundantes estudios alrededor de esta especie, no están tan enfocados a dilucidar las circunstancias de su origen y evolución como a obtener información potencialmente aplicable, es decir con implicaciones económicas y/o de carácter alimenticio.

El número cromosómico del cerdo es  $2n=38$ , y presenta un cariotipo bimodal con doce cromosomas metacéntricos, seis acrocéntricos y dos cromosomas sexuales: un cromosoma X metacéntrico de tamaño medio y un pequeño cromosoma Y (Gustavsson, 1988). Estos cromosomas presentan heterocromatina constitutiva en las regiones centroméricas de todos los autosomas y del cromosoma X, así como en el *brazo q* del cromosoma Y (Schnedl y col., 1981; Gustavsson, 1988). Esta tendencia bimodal del cariotipo no implica necesariamente características comunes entre los cromosomas que pertenecen a un mismo subgenoma (metacéntrico o acrocéntrico), sin embargo las secuencias de ADN altamente repetido que se localizan en las regiones de heterocromatina centromérica sí muestran comportamientos asociados al subgenoma al que pertenecen (Schwarzacher y col., 1984; Jantsch y col., 1990; Adegá y col., 2005).

El experimento aquí descrito se planteó con la intención de profundizar en la historia evolutiva del cerdo a través del estudio de las diferencias existentes entre los

genomas de distintas razas de cerdo en sus secuencias de ADN altamente repetidas, y para ello se compararon mediante W-CGH tres razas con tres orígenes distintos. Una raza norteamericana: Duroc, y dos europeas: la raza Ibérica y la raza híbrida Landrace/Largewhite. Los resultados obtenidos muestran como los genomas de tres individuos de tres razas distintas de cerdo doméstico (Duroc, Ibérica y Landrace/Large White) revelan diferencias en la cantidad de secuencias de ADN altamente repetidas presentes en las regiones de heterocromatina centromérica de sus subgenomas metacéntricos. Los resultados mostrados corresponden estrictamente a diferencias entre tres individuos. Debido a las dificultades derivadas de la obtención de este tipo de muestras, no se pudieron contrastar los resultados más que en otra ocasión (con otros tres individuos, uno de cada raza). No obstante, las extraordinarias características de estos resultados (que involucran subgenomas completos y no polimorfismos concretos de uno u otro cromosoma), no parece descabellado extrapolar las conclusiones obtenidas en estos individuos a sus razas, manteniendo las debidas reservas.

#### 6.2.2.1 Autosomas

Cuando los genomas de dos individuos de las razas Ibérica y Duroc se comparan mediante W-CGH, el genoma marcado del individuo de raza Ibérica hibrida predominantemente las regiones de heterocromatina centromérica del subgenoma metacéntrico (Fig. 6a). Lo mismo ocurre cuando el genoma del individuo de raza Ibérica se compara con el de raza Landrace/Large White (Fig. 6b). Y cuando se comparan genomas de individuos de razas Duroc y Landrace/Large White, el genoma marcado de éste último hibrida preferentemente las citadas regiones (Fig. 6c). Por el contrario, la hibridación en las regiones de heterocromatina centromérica del subgenoma acrocéntrico parece repartirse siempre entre los dos genomas marcados presentes en la SH (Fig. 6a', 6b', 6c'). Es decir, bajo la resolución de la W-CGH podemos concluir que los tres individuos de las tres razas poseen secuencias semejantes en las regiones de heterocromatina centromérica, pero los ADNs repetidos que forman parte de los bloques de heterocromatina constitutiva del subgenoma metacéntrico están diferencialmente duplicados, siendo más abundantes en el individuo de raza Ibérica, seguido del Landrace/Large White y por último del Duroc. Estas diferencias observadas en las regiones de heterocromatina del subgenoma metacéntrico que indican la existencia de distintas *abundancias relativas*, es decir distinto número de copias de las secuencias de ADN altamente repetidas entre las tres razas, no implican diferencias en la composición de estas secuencias. Por otro lado, el número de copias de las secuencias de ADN altamente repetidas permanece estable en el subgenoma acrocéntrico. Este tipo de variación intra-específica implicando dinámicas distintas en distintos subgenomas puede ser considerada extraordinaria en mamíferos. También es llamativo que este hecho se repita cuando el individuo implicado en las comparativas es de la raza híbrida

Landrace/Large White. Porque, aunque su genoma procede de la unión de dos razas diferentes, cuando éstas se encuentran mezcladas despliegan el patrón que podría ser el general en el cerdo: subgenoma acrocéntrico homogéneo y subgenoma metacéntrico heterogéneo.

Estos patrones de divergencias contrastan con los tamaños de los bloques de heterocromatina de los cromosomas de uno y otro subgenoma. Ya que en el cariotipo del cerdo, el patrón de heterocromatina constitutiva que se obtiene con bandas-C muestra bloques notablemente grandes en el subgenoma acrocéntrico, mientras que en el metacéntrico parecen comparativamente pequeños (Lin y col., 1982), hecho también observable en los experimentos de W-CGH (Fig. 7). Lo cual no es sorprendente, ya que el tamaño de un bloque de heterocromatina no está relacionado directamente con el grado de polimorfismo de sus secuencias. Hasta la fecha tampoco se han descrito diferencias en los tamaños de los bloques de heterocromatina entre los cariotipos de distintas razas, probablemente porque las diferencias no son detectables mediante bandas-C.

Con respecto a las secuencias de ADNsat del cerdo, se ha propuesto en ocasiones anteriores que son profundamente distintas entre los dos subgenomas. De hecho se han descrito dos familias de ADNsat (Ac2 y Mc1), exclusivas de los subgenomas acrocéntrico y metacéntrico (respectivamente), que suponen la mayoría de la heterocromatina presente en este organismo. A pesar de mostrar una notable falta de homología entre ellas, Ac2 presenta, sin embargo, una gran homología dentro de los cromosomas acrocéntricos, y, por el contrario, Mc1 se muestra como una familia muy divergente entre los metacéntricos (Jantsch y col., 1990; Adegá y col., 2005)

Estas observaciones resultan interesantes y complementan los resultados obtenidos tras los experimentos de W-CGH, ya que la técnica se encuentra limitada a la hora de ofrecer conclusiones sobre diferencias intra-genómicas, puesto que los resultados en los experimentos de W-CGH se obtienen a partir de sondas que aglutinan todo el genoma y su objetivo es estudiar diferencias entre distintos genomas. Sin embargo en este caso concreto, debido a las características de los resultados, parece oportuno suscribir el citado hecho de que los ADNs repetidos del subgenoma acrocéntrico son altamente homogéneos. Pero parece coherente presumir que los del subgenoma metacéntrico también lo sean en un grado muy alto. Ya que, aunque las secuencias de ADN altamente repetidas del subgenoma metacéntrico presentan diferencias entre los distintos individuos de las distintas razas, en todos los cromosomas metacéntricos aparece una hibridación semejante en las regiones de heterocromatina. Esto es: no aparecen los bloques de heterocromatina en unos cromosomas del subgenoma en R y otros en G, ni siquiera se observan grandes variaciones en las intensidades de R que muestran todos ellos en un mismo experimento. Se aprecia un comportamiento global de subgenoma que parece indicar una cierta homogenización también entre las secuencias de ADN altamente repetidas de los cromosomas

metacéntricos, aunque esto no quiera decir que esta homogeneidad no sea menor que la observada para la familia Ac2, como proponen Jantsch y col. (1990) y Adegá y col. (2005). Además se ha descrito una unidad de repetición de 100 pb presente en todas las regiones centroméricas de los autosomas metacéntricos y otra de 340 pb bastante extendida en el mismo subgenoma (Miller et al., 1993), aunque también se presume que el resto de las repeticiones son específicas de cada cromosoma (Riquet et al., 1996).

De modo que, de forma global, lo que este estudio nos permiten concluir es que el ritmo de acumulación de duplicaciones afecta de distinta manera a las secuencias presentes en las regiones centroméricas de los subgenomas acrocéntrico y metacéntrico. Es decir, la divergencia de las familias de ADN<sub>s</sub> repetidos en el subgenoma metacéntrico está promovida por duplicaciones sucesivas que parecen afectar de distinta manera a cada raza. Mientras que el subgenoma acrocéntrico presenta mayor homogeneidad en cuanto a sus ADN<sub>s</sub> repetidos, y no sólo dentro de los cromosomas del subgenoma (Jantsch y col., 1990; Adegá y col., 2005) sino también entre los genomas de las distintas razas. Según el modelo de *dinámica general de los ADN<sub>s</sub>* de Nijman y Lenstra (2001), las secuencias de ADN altamente repetidas que aparecen altamente homogéneas dentro de un genoma se encuentran en la fase inicial de su existencia, mientras que la segunda fase implica duplicaciones y deleciones para posteriormente empezar a dar lugar a secuencias divergentes entre sí, hasta finalmente ser reemplazadas por otras secuencias. El comportamiento descrito para la fase inicial podría asemejarse al de las secuencias del subgenoma acrocéntrico, mientras que los ADN<sub>s</sub> repetidos del subgenoma metacéntrico podrían encontrarse en la segunda fase, y por eso dar lugar a diferencias tanto intra-genómicas como entre los individuos de las distintas razas. Esta disposición de los acontecimientos, que además supondría la existencia previa de ambas familias de secuencias en el ancestro de los individuos estudiados, implicaría que las secuencias de ADN altamente repetidas de uno de sus subgenomas (el metacéntrico) serían más antiguas que las del acrocéntrico, que serían de aparición más reciente, aunque anteriores a la separación de los antepasados de las tres razas. Esta situación puede aportar algo de luz a la hora de aproximarse a obtener conclusiones sobre los orígenes del genoma del cerdo, aunque no se puede descartar que sean otros los procesos que han provocado el panorama presente.

#### 6.2.2.2 *El cromosoma Y*

Con respecto al cromosoma Y del cerdo existe mucha menos información disponible. Tan sólo se ha descrito una secuencia específica (McGraw y col., 1988), pero no se ha identificado ningún ADN<sub>s</sub> en la región heterocromática (Janzen y col., 1999; Adegá y col., 2005). En nuestros experimentos, el cromosoma Y muestra su

propia *historia evolutiva* con dos regiones potenciales albergando diferentes familias de secuencias de ADN altamente repetidas, y mostrando distinto número de copias en cada raza. El hecho de que se observen dos resultados independientes en las regiones proximal y distal del bloque de heterocromatina del cromosoma Y cuando se comparan los individuos de las razas Ibérica y Landrace/Large White con W-CGH (Fig. 6b''), predice la presencia de, al menos, dos familias principales de ADNs repetidos en dicho bloque (dentro de lo que se presenta como un bloque homogéneo observando su bandeo-C). De nuevo gracias al uso de controles, se puede comprobar que las secuencias presentes en el bloque de heterocromatina del cromosoma Y pertenecen a la misma familia en los individuos de las tres razas estudiadas. Es decir, son semejantes en cuanto a su composición y tan sólo se observan distintas *abundancias relativas*. Los resultados obtenidos nos permiten establecer un orden jerárquico entre los individuos de las tres razas en el número de repeticiones de las secuencias de las dos regiones del cromosoma Y: el individuo de raza Ibérica tiene el número más alto de copias en la familia de ADNs repetidos presente en la región proximal del *brazo q* del cromosoma Y, seguido de los individuos de raza Landrace/Large White y Duroc, en ese orden. Con respecto a la región distal del mismo bloque, el individuo de raza Landrace/Large White presenta el mayor número de copias seguido de los de raza Ibérica y Duroc, respectivamente. En el caso concreto de este cromosoma, la ausencia de recombinación que afecta a las secuencias del cromosoma Y puede haber favorecido su rápida divergencia.

En resumen, con este estudio y teniendo en cuenta las características de la W-CGH, podemos concluir que han ocurrido distintos *tempos* dentro del genoma de *Sus domesticus*: uno que afecta al subgenoma acrocéntrico, otro al metacéntrico y por último uno que afecta al cromosoma Y.

### 6.3 W-CGH inter-específica

#### 6.3.1 El género *Microtus*

*Microtus* es uno de los géneros de mamíferos que engloba a un mayor número de especies, unas 150, es decir, aproximadamente la mitad de las que comprende la subfamilia *Arvicolinae* (Musser y Carleton, 1993). Además estos roedores se consideran los mamíferos herbívoros más abundantes de diversas zonas del hemisferio norte (Mitchell-Jones y col., 1999). El presente estudio centró su atención en dos especies concretas: *Microtus cabreræ* (CAB) y *Microtus nivalis* (NIV). CAB es una especie endémica de la península Ibérica y se presume que surgió a partir de NIV, que es una de las especies más primitivas del género y se encuentra extendida por toda Europa. Por tanto se piensa que el cariotipo de NIV podría ser el más parecido al ancestro común de

todas las especies de *Microtus*, y tanto éste como el de CAB presentan un número cromosómico de  $2n=54$ . Las distintas especies del género *Microtus*, presentan gran variabilidad en la cantidad de material positivo a bandas-C, es decir, en la cantidad de heterocromatina constitutiva que muestran en las regiones centroméricas de sus cromosomas (Modi, 1993a). De entre todas las especies descritas hasta la fecha, CAB es la especie del género *Microtus* que posee los bloques de heterocromatina centromérica autosómica de mayor tamaño (Modi, 1993a). En cuanto a los cromosomas sexuales, mientras que en la mayoría de las especies de mamíferos y del género *Microtus* (como por ejemplo NIV) tan sólo el cromosoma Y presenta un bloque de heterocromatina, en CAB tanto el cromosoma X como Y muestran un bloque de tamaño extraordinario (éste último especialmente grande), dando lugar a una pareja de cromosomas sexuales frecuentemente denominados “gigantes” (Marchal y col., 2004). Dentro de los bloques de heterocromatina de los cromosomas sexuales de las especies de este género se han caracterizado numerosas secuencias, y éstas han sido descritas como heterogéneas y especie-específicas en composición y distribución (Marchal y col., 2004).

En *Microtus* se han descrito detalladamente al menos seis familias de secuencias de ADN altamente repetidas formando parte de los bloques de heterocromatina centromérica: MSAT160, MSAT2570, MSAT21, MS2, MS4 y STR47 (Modi y col., 2003). La secuencia MSAT-160 ha sido descrita tanto en las regiones centroméricas de CAB como de NIV. (Modi, 1993a; Modi y col., 2003). Se trata de una secuencia de 161 pb rica en pares de bases AT que se considera que ha sufrido procesos de *evolución concertada* que han llevado a su homogenización a lo largo del genoma (Fernández y col., 2001a).

En nuestro estudio comprobamos mediante FISH, que la secuencia MSAT-160 de CAB (MSAT-CAB) hibrida las regiones centroméricas de todos los autosomas y la del cromosoma Y de CAB, pero no hibrida el resto de las regiones heterocromáticas de los cromosomas sexuales ni de los autosomas de NIV (Fig. 8). Y la secuencia MSAT-160 de NIV (MSAT-NIV) muestra un comportamiento semejante sobre el genoma de NIV hibridando las regiones centroméricas de los autosomas, pero no muestra señal de hibridación en el genoma de CAB (Fig. 9). La falta de hibridación recíproca de las secuencias MSAT-160 de CAB y NIV, invita a dudar de la homología entre estas secuencias englobadas bajo el mismo nombre. Si bien es cierto que al rebajar la astringencia de los experimentos se observa una cierta hibridación de MSAT-CAB en NIV y MSAT-NIV en CAB, que podría ser reflejo de su origen común.

Con el fin de averiguar las semejanzas y diferencias existentes en la composición de los bloques de heterocromatina de autosomas y cromosomas sexuales de CAB y NIV, y también con la intención de analizar la presencia en estas regiones cromosómicas de la secuencia altamente repetida MSAT-160 descrita en ambos (Modi, 1993a; Modi y col., 2003), se compararon sus genomas mediante W-CGH. En un primer acercamiento se observó que las secuencias de ADN altamente repetidas que

forman los bloques de heterocromatina de CAB y NIV son claramente diferentes, tanto en todos los autosomas como en los cromosomas sexuales (Figs. 10, 11, 12 y 13). Este hecho no es sorprendente ya que se considera que, en general, el género *Microtus* muestra grandes diferencias en cuanto al número de copias de las repeticiones en tándem existentes en posiciones homólogas (Modi, 1993a) y además posee una de las mayores tasas de evolución cariotípica (Maryama e Imai, 1981). En el caso estudiado, las dos especies mostraron diferencias en la composición de las secuencias de las regiones de heterocromatina constitutiva, y no diferencias en la *abundancia relativa*. También se puede confirmar experimentalmente que, efectivamente, como ya adelantó Modi (1993a), las regiones de heterocromatina son globalmente mayores en CAB que en NIV.

Cuando se comparan los genomas de CAB y NIV mediante W-CGH y se añade la secuencia MSAT-160 de CAB o NIV marcada para ser revelada mediante fluorescencia, se observa con precisión en qué grado está presente esta secuencia en los genomas de las especies estudiadas. Tanto en el genoma de CAB como en el de NIV, aparece su correspondiente secuencia MSAT-160 en sus respectivas regiones centroméricas, siendo la presencia en NIV muy notable y discreta en CAB (Figs. 14-22). En ambos casos esta secuencia tan solo conforma una parte de dichas regiones, por lo que se deduce la necesaria existencia de otras secuencias en las regiones centroméricas.

Por tanto, el estudio bajo W-CGH de los genomas de CAB y NIV nos permite concluir que existen diferencias notables en la composición de las regiones de heterocromatina constitutiva de estas especies. La secuencia MSAT-160 de ambas especies posee un grado de homología muy bajo entre CAB y NIV, y se encuentra presente en las regiones centroméricas de todos los autosomas (en CAB también aparece en la región centromérica del cromosoma Y. En CAB y NIV la secuencia MSAT-160 es tan sólo una de las componentes de la heterocromatina, aunque su presencia en NIV es proporcionalmente más destacable.

Para llevar a cabo este estudio tan sólo se empleó un individuo de cada especie (machos). Sin embargo, nos parece que estos resultados se pueden extrapolar a la comparación entre especies dado que afectan de forma global a todo el genoma, es decir en todas las regiones de heterocromatina se presentan radicalmente divergentes los genomas de las dos especies. Así como en todas las regiones centroméricas la abundancia de MSAT-160 es notablemente mayor en NIV que en CAB. En ningún caso se trata de diferencias puntuales de un cromosoma que pudieran sugerir una dinámica distinta si se analizasen otros individuos.

En cualquier caso el interés de este experimento principalmente radica en que se trata de un estudio preliminar realizado sobre dos especies escasamente caracterizadas, de las que simplemente existen algunas secuencias descritas y poca información integrada. Por tanto se presentaban como el objetivo ideal para un análisis descriptivo y



una aproximación al problema mediante W-CGH. Que, en este caso, combinada con FISH orienta la dirección que una investigación puede tener, mediante planteamientos sencillos. Además de informar de la situación global de los genomas de dos especies y de las dinámicas evolutivas de las familias de secuencias altamente repetidas que los componen.

### 6.3.2 El género *Arcyptera*

*Arcyptera tornosi* (AT) y *Arcyptera fusca* (AF) son dos especies relacionadas evolutivamente con dos cariotipos que muestran un bajo nivel de diferenciación al ser analizados mediante bandas-C ( $2n=22 + X0/XX$ ) (Gosálvez y col., 1981). Los cromosomas de AT y AF presentan heterocromatina constitutiva en las regiones centroméricas de todos los cromosomas. Además algunas de estas regiones son polimórficas en ambas especies y se han descrito segmentos de heterocromatina supernumeraria (de la Torre y col., 1986). Sin embargo, los resultados obtenidos con W-CGH permiten localizar más diferencias entre ambos genomas de las que habían sido descritas hasta ahora. La observación de dos señales discretas con distintos rangos de fluorescencia en los bloques de heterocromatina distal de los cromosomas de AT y AF pone de manifiesto la existencia de, al menos, dos familias distintas de secuencias de ADN altamente repetidas formando parte de dichos bloques (Fig. 23a-e). Una de estas familias de ADNs repetidos se localiza en la región proximal de los bloques de heterocromatina y muestra mayor abundancia de copias en el genoma de AF que en el de AT y la denominamos *DAF-1*. Por otra parte la familia *CAT-1*, localizada en posición distal, muestra mayor representación en el genoma de AT que en el de AF. De nuevo, por tanto, es destacable la eficacia de la W-CGH a la hora de profundizar en el estudio de las características de genomas que en un principio muestran unos niveles de homogeneidad alto, como ocurre en este caso tras el análisis con bandas-C. Y también muy especialmente en aquellos casos en los que no se conocen las características de las secuencias de ADN altamente repetidas de los genomas. En nuestro caso, las familias *DAF-1* y *CAT-1*, presentes en todos los cromosomas de AT y AF, presentan diferencias en su *abundancia relativa* entre estas dos especies. Por tanto se trata de secuencias no-divergentes en cuanto a la *composición* de sus secuencias, y con una clara representación diferencial en ambos genomas.

En el caso de AT y AF se sabe que la especie endémica del sistema central (AT) procede de poblaciones aisladas de AF (Gosálvez o y col., 1981, López-Fernández y Gosálvez, 1981, 1983), por ello es interesante el hecho que determinadas secuencias repetidas estén presentes en ambos genomas, aunque probablemente estén sufriendo distintos procesos de duplicación y delección en AT y AF. En términos evolutivos, la separación física de estas dos especies es reciente y probablemente se relacione con el movimiento de los hielos en las últimas glaciaciones. Esto le confiere un tiempo

evolutivo relativamente corto para lograr mayores diferencias que las observadas entre ambos genomas. Sin embargo, la W-CGH nos ha permitido observar qué tipo de diferenciación está ocurriendo y probablemente sea lógico pensar que las diferencias en *abundancia relativa* que se observan entre AF y AT precedan a futuros cambios en la *composición de secuencia*, como propone el modelo de *dinámica general de los ADNsat* de Nijman y Lenstra (2001).

Además de los resultados obtenidos sobre la representación de las distintas familias de secuencias de ADN altamente repetidas observadas, en este estudio concreto, la W-CGH nos ha permitido observar dos resultados novedosos adicionales. En primer lugar aparece una región concreta de eucromatina representada de forma más abundante en el genoma de AT que en el de AF (Fig. 23i), hecho sorprendente entre especies tan cercanas evolutivamente, aunque está aún por estudiar a qué secuencia corresponde. La segunda novedad atañe a un acontecimiento dinámico como es la condensación meiótica. Una de las características de la heterocromatina es su replicación tardía, que en este experimento concreto resulta evidente. La información detectada permite inferir distintos grados de condensación en los diferentes bloques de heterocromatina en función de la concentración de la señal fluorescente R o G. Y se observa como la familia *DAF-1* se condensa de forma más temprana que *CAT-1* (Fig. 23f-i). Más allá del significado concreto de este hecho, nos permite poner de manifiesto un innovador tipo de resultado estructural que nada tiene que ver con los obtenidos previamente mediante W-CGH.

## 6.4 Hibridación Genómica Comparativa Completa intra-genérica

### 6.4.1 *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla* y *Chlorocebus aethiops*

Los resultados obtenidos a partir de la comparación de genomas de distintos primates mediante W-CGH ponen de relevancia el alto grado de divergencia existente entre las secuencias de ADN altamente repetidas (exceptuando ciertas familias puntuales) de las distintas especies de este orden. Sin embargo, existen numerosos estudios, generalmente basados en comparaciones de secuencias codificantes, que ponen de manifiesto el alto grado de semejanza existente, y que han permitido elaborar clasificaciones taxonómicas que enmarcan al hombre entre sus *parientes* más cercanos. A pesar de ello esta clase de estudios resultan conflictivos por motivos de diversa índole, desde la complejidad intrínseca de su elaboración hasta sus propias limitaciones técnicas, y por supuesto su dimensión social.

De hecho, han pasado ya más de 100 años desde que T.H. Huxley propusiese la estrecha relación evolutiva existente entre el hombre y los grandes simios africanos (1863), y aún no se conoce con claridad cuáles son las relaciones evolutivas precisas entre los primates no extinguidos. Sin duda la del científico inglés era una afirmación

osada para la época, y no consiguió la aceptación por parte de la comunidad científica, y aunque ése es un capítulo conocido y popular de la historia de la ciencia, en gran parte por la polémica que provocó, no se trataba del primer estudio que se realizó en esa dirección. Anteriormente, en 1699, Edward Tyson había propuesto una continuidad biológica entre el chimpancé y los pigmeos, y es también sabido que fueron precisamente estas investigaciones las que invitaron a Linneo a proponer la clasificación del hombre entre los primates (aunque sin incluir ninguna idea de *evolución*, como se ha dicho). Hoy en día, sin embargo, existe la aceptación generalizada (aunque sorprendentemente no unánime) de la estrecha relación evolutiva entre el hombre y los grandes simios, así como de la importancia de la *selección natural* como motor de la evolución. Y actualmente se clasifica como *hominidos* a una familia compuesta por el *Homo sapiens* (hombre), el *Pan troglodytes* (chimpancé), el *Pan paniscus* (bonobo), el *Gorilla gorilla* (gorila) y el *Pongo pygmaeus* (orangután). Y a los *homininos* como una subfamilia que incluye a las cuatro primeras especies.

Los primeros estudios moleculares que permitieron justificar una clasificación taxonómica de los homínidos fueron los de Goodman (1962, 1963a, 1963b) y los de Sarich y Wilson (1967a, 1967b) basados en técnicas inmunológicas. El primero propuso que las especies africanas (chimpancé y gorila) eran más cercanas al hombre que las asiáticas (orangután y gibón). Y los segundos afinaron el tiempo de divergencia de los homínidos hasta 5 millones de años (MA), aunque consideraban a todos los grandes simios equidistantes filogenéticamente. Desde entonces, numerosos estudios con diversas técnicas se han encargado de demostrar la mayor cercanía filogenética del hombre con los primates africanos que con los asiáticos (revisión en Saitou, 2005), pero no fue hasta 1995 cuando se propuso agrupar al chimpancé como el pariente más cercano del hombre (Horai y col., 1995). A pesar de que King y Wilson (1975) comparando secuencias de aminoácidos ya habían sido pioneros en cuantificar diferencias y habían establecido la semejanza entre el hombre y el chimpancé en un 99%. Gracias a estos y otros estudios llevados a cabo mediante comparaciones de secuencias de ADN entre especies, se han podido concluir los tiempos de divergencia entre las distintas especies, siendo los más aceptados los siguientes: el hombre compartió un ancestro común con el chimpancé y el bonobo hace aproximadamente 4-6 MA y con el gorila hace unos 7-8 MA. En última instancia todos los homínidos descienden de un ancestro común, el Procónsul, que en algún momento estimado hacia 12-16 MA también salió de África hacia Asia dando lugar posteriormente al orangután. Cuando se trata de incluir a más primates en la clasificación surgen controversias, pero entre los homínidos parece estar aceptada la citada cronología aproximada. Aunque hay que tener en cuenta que estas cronologías han sido establecidas en base a un *reloj molecular*, teoría que ofrece diversos factores criticables, lo cual no la convierte en absoluto en una herramienta inútil pero provoca que los resultados que ofrece se encuentren en permanente revisión, ya que cualquier descubrimiento paleontológico puede alterar las dataciones previas y obligar a reconsiderar todos los cálculos

evolutivos hechos en base a éstas. Tal es el caso de lo acontecido a raíz de la datación propuesta por Arnason y col. (2000), que sitúa la divergencia de los géneros *Homo-Pan* hace 10,5-13 MA frente a los 4-6 MA extensivamente aceptados, e invita a ser prudente con los resultados obtenidos en este campo de investigación.

El presente estudio ha centrado su interés en la comparación de los genomas del chimpancé y el gorila con el del hombre, y se ha intentado añadir un punto de vista más a la disputa existente en torno a la filogenia de los homínidos. El genoma del mono verde (*Chlorocebus aethiops*) se ha empleado como especie externa. No se ha podido incluir el genoma del orangután en el estudio por falta de disponibilidad del material necesario pero consideramos que habría sido de gran interés, porque al ser esta la especie mas alejada del hombre de todos los hominidos podría haber ofrecido interesantes resultados, así como haber puesto a prueba la capacidad resolutive de la W-CGH con individuos de su condición y grado de parentesco.

#### 6.4.1.1 Resultados cualitativos

Desde hace tiempo se subrayó la gran semejanza existente entre los cariotipos del hombre y de los grandes simios (Yunis et al., 1980) (Fig. 40). Los cambios más destacables son: i) una fusión telomérica presente en el hombre ocurrida entre dos cromosomas acrocéntricos para dar lugar al cromosoma 2 (en el chimpancé se corresponde con los cromosomas 12 y 13; y en el gorila con los cromosomas 12 y 14) (Chu y Bender, 1962; Yunish y Prakash, 1982), este hecho provoca que el numero cromosómico del hombre sea  $2n=46$  y el del resto de los homínidos  $2n=48$ . ii) Una translocación recíproca entre los cromosomas de gorila homólogos a los cromosomas 5 y 17 del hombre (Stanyon y col., 1992). Sumando a estas diferencias todas las inversiones existentes, en el resto de los casos cada cromosoma humano es homólogo de los cromosomas del resto de especies de homínidos, aunque conviene tener presente que existen muchas más diferencias cromosómicas de menor dimensión. Murphy y col. (2005) describen 40 puntos de rotura que se han clasificado como específicos de primates. Newman y col. (2005) han descrito 651 sitios de reorganización entre los genomas del chimpancé y el hombre, y también se han descrito numerosos casos de elementos transponibles o secuencias altamente repetidas (especialmente elementos *Alu*) que se han insertado en genes concretos o zonas localizadas del genoma (Gagneux y Varki, 2001).

Recientemente se ha prestado un relativo creciente interés a la influencia de las regiones centroméricas en la evolución de los primates. Principalmente debido a la implicación que tienen en el origen de diversos síndromes (Mewborn y col., 2005), así como en la evolución de cariotipos de las especies (Li y col., 2000). Pero aún existe una gran carencia en cuanto a información más general sobre la dinámica de las secuencias

de ADN altamente repetidas dentro de los genomas de primates. De igual manera, la repercusión de estos cambios en la evolución de estas especies está lejos de estar bien estudiada así como de llegar a comprenderse. Aunque se ha manifestado que la composición de las regiones centroméricas es una de las principales diferencias entre el hombre y los grandes simios (García y col., 1999; Alexandrov y col., 2001), se ha considerado que este hecho es tan sólo consecuencia de que la evolución de los ADNs repetidos es mucho más rápida que la de los no-repetidos, generalmente sometidos a presión selectiva (Archidiacono y col., 1995).

Efectivamente los estudios realizados mediante W-CGH suscriben, en líneas generales, esta última afirmación. Cuando se compara el genoma del hombre con el de cualquiera de los otros primates estudiados (chimpancé, gorila y mono verde), se observa que las regiones centroméricas de los linfocitos humanos muestran una clara predominancia de hibridación del genoma de V2. Sin embargo en los brazos cromosómicos (y en las regiones de eucromatina, en interfase) los distintos primates estudiados son extremadamente semejantes entre sí. Además, en base a los resultados observados, se puede concluir que la gran mayoría de las diferencias observadas entre el hombre y el resto de las especies de primates en sus secuencias de ADN altamente repetidas, son de *composición de secuencia*. No se trata de distinto número de copias de una misma familia sino de distintas familias de ADNsat, como demuestran los experimentos hechos comparando mediante W-CGH genomas de primates-no humanos sobre linfocitos humanos. Sin embargo existen ciertos cromosomas en los que se observa que sí existe una distinta *abundancia relativa* en ciertas secuencias de ADN altamente repetidas. En el caso del chimpancé se observa que al compararse con el hombre muestra una leve señal de hibridación en R (de CH-R) en la región pericentromérica del cromosoma 1 humano, la correspondiente al satélite-alfa (Figs. 24c, 27b y 31c). Y cuando se compara con el hombre, el gorila muestra destacable señal de hibridación en el cromosoma 9 del hombre, en toda la región centromérica (probablemente involucrando tanto a la familias de satélite-alfa como de satélite Clásico III) (Figs. 24d, 28b'). Al menos en estos dos casos, el chimpancé y el gorila comparten la misma familia de secuencias con el hombre, aunque representadas con distinto número de copias, siendo la diferencia en el caso del cromosoma 1 entre el hombre y el chimpancé de mucho mayor rango. Estos resultados se ven confirmados cuando se comparan mediante W-CGH los genomas de primates-no humanos hibridados sobre linfocitos humanos donde se observa que tanto chimpancé como gorila hibridan la región pericentromérica del cromosoma 1 y la región centromérica del cromosoma 9 del hombre (Figs. 32 y 33). Por tanto, se deduce que las secuencias de ADNsat presentes en estos cromosomas humanos son compartidas con las respectivas especies, y en este caso se trata de distinta *abundancia relativa*. En el resto de las regiones existen diferencias entre el hombre y los distintos primates estudiados en la composición de las familias de ADNsat.

Además es destacable que los experimentos realizados entre primates no-humanos nos permiten observar una mayor *abundancia relativa* del genoma de chimpancé sobre los brazos de los cromosomas humanos, que cuando se hibrida el genoma de gorila (Fig. 32b-c') (aunque este resultado se analizará detalladamente más adelante). Así como también una mayor hibridación tanto del genoma del chimpancé, como del de gorila, comparados con el de mono verde (Figs. 33 y 34). Con respecto a esa especie, es más que importante la absoluta ausencia de hibridación del genoma marcado de mono verde en todas las regiones centroméricas del hombre (Figs. 33 y 34).

Por otro lado, hay que tener también en cuenta que estos resultados se ofrecen bajo la resolución de la W-CGH y probablemente otras regiones además de las descritas muestren identidad de *composición de secuencias* entre el hombre y otros primates, pero no son detectables con esta técnica.

No es sorprendente que entre las familias de ADNsat que el chimpancé y gorila presentan en común con el hombre, se encuentren familias de satélite-alfa, puesto que este ha sido descrito en todas las especies de primates (Willard, 1991; Luke y Verma, 1995). Aunque se han establecido dos patrones de esta familia concreta, el más sencillo descrito (variante A) lo presentaría el mono verde (Goldberg y col., 1996; Yoda y col., 1996) y presenta diferencias suficientes como para no desplazar en la hibridación a la variante más compleja, la que presentan los grandes simios africanos (variante B), que además presenta la facultad de unir la proteína CENP-B (Alexandrov y col., 2001). Asimismo, el satélite clásico III se considera común a todas las especies que han divergido hace menos de 24 MA, mientras que los satélites clásicos I y II del hombre son de origen más reciente y sus sondas hibridan sólo en condiciones de muy baja astringencia en otros primates (Mitchell y col., 1981; Fowler y col., 1989). En nuestro estudio tan sólo el satélite clásico III del cromosoma 9 humano ha mostrado semejanza con el de gorila, ningún otro satélite clásico en ningún cromosoma ha mostrado una respuesta semejante. Al respecto cabe añadir que se considera que el orangután y el gorila poseen la forma ancestral de cromosoma 9, de la que derivaría la del hombre tras una inversión pericéntrica. Tras separarse la línea del hombre y el chimpancé, éste último sufriría otra inversión pericéntrica adicional (Dutrillaux y col., 1986). En un estudio de Haaf y Schmid (1987) se afirma que la heterocromatina del hombre es en líneas generales más semejante a la del gorila que a la del chimpancé. Sin duda sería interesante, y quizá esclarecedor, ver qué ocurre con respecto a la región centromérica del cromosoma 9 de humanos tras un experimento de W-CGH enfrentando los genomas de hombre y orangután. Así como también lo sería analizar la posible funcionalidad del ADNsat concreto de ese cromosoma particular y comprobar en qué región o regiones centroméricas se encuentra localizada la secuencia en el cariotipo de gorila, ya que no hay ninguna razón para asegurar que se encuentre en el cromosoma correspondiente de gorila (el cromosoma 10, homólogo del cromosoma 9 humano). Porque es importante tener en cuenta que las familias de ADNsat que comparten el hombre, el chimpancé y el gorila no tienen porque estar localizadas exactamente en los mismos cromosomas en los

genomas de estos primates. De hecho Samonte y col. (1997) hibridaron 21 sonda de satélites-alfa específicos de cromosomas humanos sobre metafases de chimpancé, gorila y orangután y observaron como la mayoría de las sondas no hibridaban sobre el cromosoma equivalente al humano, aunque si aparecieron algunas señales de hibridación en cromosomas no-equivalentes, concluyendo que habían ocurrido rápidos cambios en la evolución de la secuencia del satélite-alfa, a pesar de que éste ha sido relacionado con frecuencia con funciones clave en los procesos de división celular, tanto en mitosis como en meiosis (Willard, 1998).

#### *6.4.1.2 Resultados cuantitativos: la identidad citogenética (IC) y las distancias génicas*

Aunque las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de primates han quedado establecidas con una aceptación mayoritaria por parte de la comunidad científica, el grado de parentesco entre éstas se encuentra permanentemente en revisión desde 1975, siendo además muy abundantes los estudios enfocados a ofrecer un valor que recoja la semejanza que muestra el hombre con sus especies más cercanas. En una de las primeras aproximaciones a este problema, que fue de gran relevancia en la época, se comprobó la alta similitud existente entre el hombre y los grandes simios mediante un estudio realizado mediante el análisis de la secuencia de la región *Psi eta* de una globina en homínidos (Miyamoto y col., 1987). Según esta comparación, el hombre difiere del chimpancé en un 1,61% y del gorila en un 1,84%, mientras que la diferencia entre dos hombres cualesquiera se establecería en un 0,67%. Posteriormente, en un estudio bastante más amplio, se analizaron y compararon secuencias de más de 10.000 regiones que ocupaban un total de 3 Mb y que ofrecieron unos valores de divergencia del 1,24% entre el hombre y el chimpancé (Ebersberger en 2002). Y más recientemente se ha publicado el borrador del genoma del chimpancé junto con una comparativa de éste con el genoma humano, y se ha corroborado el valor de 1,23% de diferencias entre sus secuencias nucleotídicas (The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, 2005). Sin embargo, en la aproximación a la cuantificación de las diferencias existentes entre distintos primates mediante W-CGH presentada en esta memoria, los resultados obtenidos son radicalmente distintos. Principalmente debido a la forma de obtenerlos. Por un lado se trata de una aproximación citogenética y no molecular como la mayoría de los estudios en este ámbito. Esto puede suponer una desventaja en precisión, pero posee una notabilísima ventaja. Ésta es que mediante nuestro método se analiza la totalidad del genoma, no una o varias secuencias elegidas. Por tanto también las secuencias de ADN altamente repetidas, que siempre están excluidas en este tipo de análisis y que pueden ocupar una proporción nada desdeñable del contenido total de ADN de un genoma. En especial en los análisis de comparación de secuencias, y principalmente porque han supuesto un problema en la secuenciación del genoma humano (Bailey y col., 2001, 2002), pero también debido a que, como ya se ha visto,

son altamente divergentes, característica que precisamente las hace interesantes bajo nuestro punto de vista, ya que para estimar divergencias relativamente cortas, como éstas, las secuencias no codificantes y por tanto con mayor tasa de acumulación de mutaciones pueden ser más eficaces que las secuencias codificantes, que están sometidas a una mayor presión selectiva (Glazko y Nei, 2003). Efectivamente, si se toman como referencia las secuencias de ADN altamente repetidas las diferencias que encontraríamos serían mucho mayores que las existentes entre otro tipo de secuencias.

Al comparar mediante W-CGH el genoma de un individuo (V2) con sí mismo, a modo de control de los experimentos, los resultados obtenidos muestran una hibridación casi idéntica de los genomas marcados en G y R (IC=99%), como se esperaba para poder otorgar credibilidad a todo el estudio. Sin embargo comparando los genomas de dos individuos de la misma especie (pero de distinto sexo: M2 y V2), el grado de semejanza entre individuos de la misma especie (humana), no resulta extremadamente alto en comparación con lo publicado previamente: se obtiene un IC de aproximadamente un 86%. Es decir unas diferencias entre los genomas de M2 y V2 de un 14%, valor que contrasta con el 0,67% obtenido por Miyamoto y col. (1987) comparando secuencias. Precisamente en ese mismo estudio se resalta que la diferencia entre dos hombres es tan solo 2,5 veces menor que la diferencia entre un hombre y un chimpancé, y en nuestro caso ese contraste es aún menor, 1,78, como se describe más adelante. Es decir la inclusión de las secuencias de ADN altamente repetidas reduce proporcionalmente las diferencias de los contrastes hombre-hombre y hombre-chimpancé, lo que nos permite una vez más valorar lo altamente divergentes que son las secuencias de ADN altamente repetidas, incluso entre individuos de la misma especie. Ya que, teniendo en cuenta que los brazos cromosómicos presentan una hibridación homogénea de los genomas de V2 y M2 y que la mayoría de las regiones centroméricas también, podemos pensar que la responsabilidad de ese 14% de divergencia reside principalmente en las regiones centroméricas de los cromosomas 9 y 16 que son los que resultan notablemente diferentes entre estos dos individuos concretos (M2 y V2). También es notable el resultado obtenido entre M2 y V2 al practicar el experimento de forma extraordinaria sobre células de M2. El valor de IC obtenido fue de un 87%, frente a un 86% resultante sobre células de V2. Este 1% de diferencia entre estos valores puede darnos idea de la escasa influencia que tienen las células de empleadas como “referencia” sobre el resultado final. Como se ha dicho anteriormente su función es tan sólo funcionar como “pantalla”. Así como también este valor nos informa sobre el grado de los márgenes de error del experimento.

En el extremo de las diferencias más grandes obtenidas entre genomas de primates tras los experimentos con W-CGH, se presentan las observadas entre los genomas del mono verde y el hombre, con un 29% de divergencia (IC=71%). Resulta un dato interesante ya que en este caso no existía ninguna región centromérica del cariotipo humano hibridada por el genoma del mono verde. Además de que la totalidad del genoma de *referencia* (del hombre, V2) presentaba una fluorescencia ligeramente



desplaza hacia el G (de V2-G) (Fig. 29b-c'), lo cual nos permite concluir a modo de aproximación que el porcentaje de divergencia del que son responsables las regiones centroméricas será siempre inferior al 30% al comparar primates.

También son llamativas las diferencias observadas cuando se compara el genoma humano con el del chimpancé (25%; IC=75%) y con el del gorila (22%; IC=78%). Estas divergencias son mayores que todas las publicadas hasta la fecha, que se sitúan por debajo del 2%. Siendo además sorprendente que en, nuestro estudio, el gorila se presenta como más semejante al hombre que el chimpancé, cuando desde hace tiempo se postula lo contrario sin apenas controversia. Aunque nuestros resultados contradicen dicha afirmación, no pueden considerarse especialmente reveladores ni definitivos. En primer lugar porque si se atiende a las desviaciones típicas de ambas comparaciones (0,029 y 0,038, respectivamente) se observa que puede darse un cierto grado de solapamiento entre ambos ICs. En segundo lugar es necesario tener presente que estos resultados se han obtenido a partir de experimentos realizados con un solo individuo de cada especie (excepto el hombre) y se desconoce la fluctuación que podría presentarse empleando otros distintos o distinto número de individuos. Por tanto se plantea la necesidad de repetir y ampliar estos experimentos en busca de un resultado definitivo. Porque, así como desde el punto de vista molecular, es decir empleando resultados basados en valores (principalmente obtenidos a partir de la comparación de secuencias) e interpretándolos con técnicas de cladística, el chimpancé se confirma como más cercano al hombre, existen estudios que todavía ponen en tela de juicio dicha ordenación. Los estudios empleando ADN mitocondrial fueron los primeros que sustentaron la idea de que el hombre está más estrechamente relacionado con el gorila que con el chimpancé (Brown y col., 1982). Sin embargo el empleo del ADN mitocondrial se encuentra desplazado ya que tuvieron su apogeo antes de poder disponer de la abundante información sobre el ADN nuclear de que disponemos hoy en día. Además su empleo es conflictivo ya que aparentemente su tasa de mutación es altamente variable en los distintos grupos de mamíferos (Gissi y col., 2000). Por el contrario, el clásico trabajo de Caccone y Powell (1989) realizado mediante hibridación ADN-ADN dio un fuerte espaldarazo a la consideración del chimpancé como la especie más cercana al hombre (Sibley y col., 1990; Ruvolo, 1997) y desde entonces parece consolidada esa propuesta, al menos en base a los estudios posteriores de comparación de secuencias. Lo único que nos permite concluir de forma fehaciente el presente estudio, es que los genomas de chimpancé y gorila son aproximadamente igual de semejantes al del hombre. Y es que la situación es compleja como pone de manifiesto el hecho de que se hayan descrito abundantes regiones genómicas en el hombre que son más semejantes al gorila que al chimpancé (al igual que ocurre entre otros simios) (Chen y col., 2001). En parte debido a que a pesar del creciente número de datos procedente de aproximaciones moleculares, se han descuidado relativamente otros estudios sobre procesos que pueden haber tenido una gran influencia en la evolución de los primates. Este es el caso de las reordenaciones cromosómicas, que sin duda han

podido tener relevancia en la evolución de los primates, ya que pueden conducir al aislamiento reproductivo e imponer la existencia de una nueva especie. En ese ámbito se sabe que tanto el chimpancé como el gorila presentan  $2n=48$ , mientras que el hombre  $2n=46$ . Todos los homínidos comparten 6 cromosomas idénticos (en ningún caso se consideran las regiones centroméricas), pero de nuevo se presenta un hecho llamativo de explicación compleja: el hombre y el chimpancé comparten además tres cromosomas idénticos entre sí, el gorila y el chimpancé otros dos, y el hombre y el gorila ninguno. Teniendo en cuenta esta situación, y considerando altamente improbable la convergencia evolutiva, se postula que el antepasado del chimpancé pudo convivir y cruzarse con los antepasados del hombre y el gorila, que a su vez estaban aislados entre sí (Chaline y col., 1991). Esta particular teoría destapa las carencias del cálculo de distancias génicas basado en diferencias entre secuencias, ya que puede promover el establecimiento de relaciones filogenéticas erróneas o al menos incompletas, e invita a romper una lanza en favor de la consideración de las características citogenéticas. En especial de las reordenaciones cromosómicas, pero también de otras como las secuencias de ADN altamente repetidas, cuya importancia en la evolución de los genomas todavía está lejos de ser estimada.

Una faceta destacable de nuestra aproximación a la comparación de genomas de primates mediante W-CGH, es que la técnica permite establecer estimaciones cuantitativas de divergencias entre genomas, sin dejar de lado las consideraciones cualitativas que pueden observarse simultáneamente. Si bien es novedoso y ventajoso que los resultados observados tienen en consideración las diferencias entre especies en sus regiones heterocromáticas, ya que son las que la técnica revela más eficazmente, cabe añadir que los resultados casi exclusivamente se nutren de éstas. Puesto que, como se ha dicho, al nivel de resolución de la W-CGH los brazos cromosómicos no muestran (apenas, y salvo excepciones o situaciones puntuales) diferencias entre individuos de la misma especie o especies cercanas (así como no informa en modo alguno de translocaciones recíprocas o inversiones). Por tanto, aunque el cálculo del IC se presenta como un acercamiento al cálculo de distancias en el que se refleja la aportación de los genomas completos comparados, no lo hace con absoluta precisión, ya que las regiones eucromáticas no aportan apenas información. Luego aunque se trata de una metodología innovadora que es capaz de ofrecer un valor numérico que refleja de forma fidedigna las diferencias entre especies cercanas evolutivamente, es conveniente recordar que su capacidad informativa se centra en los ADNs repetidos.

Dentro de las secuencias de ADN altamente repetidas, conviene hacer una precisión en cuanto al tipo de diferencias que la IC tiene en cuenta en sus cálculos. Como se ha dicho, los resultados son calculados a partir de las cantidades de fluorescencia R y G obtenidas (Fig. 37). En anteriores ocasiones hemos podido observar que cuando entre dos genomas existen diferencias de *abundancia relativa*, el genoma

*invitado* puede hibridar más abundantemente en esa región concreta que el genoma *referencia* si es que presenta mayor número de copias que éste. Es decir, si calculásemos el valor de IC en esa región concreta, paradójicamente podría obtenerse un valor mayor que 1. Por el contrario cuando las diferencias son de *composición de secuencia*, el genoma *invitado* nunca podrá desplazar al genoma *referencia*, que en esa determinada región hibridará exclusivamente. Con estas observaciones se pretende aclarar que en el caso de que existan distintas *abundancias relativas* entre las especies comparadas, los ICs obtenidos no corresponderán a un reflejo fiel de la proporción de zonas donde los genomas de las especies comparadas son idénticos o diferentes. Ya que la distinta representación de cada una de las secuencias de ADN altamente repetidas estará afectando el valor de IC. En el caso de que las especies comparadas no muestren distintas *abundancias relativas*, entonces el IC sí que será un reflejo directo de la abundancia de regiones de homología. En los casos estudiados existían ciertas regiones (aunque escasas) entre el hombre y el chimpancé (en la región pericentromérica del cromosoma 1) y entre el hombre y el gorila (en la región centromérica del cromosoma 9), que presentaban distintas *abundancias relativas*, mientras que en la comparación del hombre con el mono verde, el IC obtenido se corresponde directamente con la proporción de sus regiones de homología puesto que todos los polimorfismos eran de *composición de secuencias*.

Sin duda el interés de ofrecer un valor que refleje las semejanzas y diferencias entre el hombre y el resto de los primates no es más que relativo. En primer lugar el resultado variará dependiendo de los individuos que se empleen, y también variará en mayor o menor grado si se estudia un genoma completo, un gen o un grupo de ellos. Además, en ningún caso los resultados serán susceptibles de aportar información alguna sobre los procesos que llevaron a la divergencia de los antepasados de las especies. Se sabe que las diferencias fenotípicas entre el hombre y el chimpancé son considerablemente mayores que las existentes entre las especies *Mus musculus* (ratón casero) y *Mus spretus* (ratón moruno), aunque las diferencias entre las secuencias son semejantes (The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, 2005). Este hecho da idea de cómo comparar secuencias no es completamente informativo ya que es mucho más determinante en qué región del genoma, genes o factores de transcripción ocurren los cambios que el número de estos. También en este punto es importante recordar que la *selección natural* actúa principalmente sobre proteínas, y en ese aspecto se han publicado estudios con diferencias de hasta un 80% de diferencias entre las proteínas estudiadas entre el hombre y el chimpancé (384 proteínas comparadas) (Glazko y col., 2005), valores que poco o nada tienen que ver con los obtenidos comparando secuencias de ADN. Pero sin embargo existe un gran interés y una destacable cantidad de atención centrada en este último tipo de estudios. Interés probablemente sustentado en la voluptuosidad que encuentra el hombre en el hecho de emplazarse entre los primates, por lo que cualquier cuantificación o calibración del

grado de semejanza se acoge con notable interés, e incluso con frecuencia encuentra eco más allá del ámbito meramente científico. Sin duda esto puede haber sido también un acicate a la hora de impulsar la proliferación de estudios poco representativos o generales, como los basados tan sólo en un solo gen, pero cabe decir en su descarga que han probado que sus resultados no difieren mucho de los realizados empleando un número más alto (aunque sí de los presentados en la presente memoria). También es cierto que toda esta abundancia y acumulación de estudios independientes e interdisciplinarios será la que nos permita aproximarnos a la verificación de la auténtica filogenia.

Más allá de la comparación de secuencias, hoy en día existen además otras formas más sofisticadas de afrontar el estudio de las semejanzas del hombre con otros primates con acercamientos más concretos que la mera cuantificación de diferencias. Destacan los estudios de expresión génica tejido-específica en cerebro de hombre y otros primates, que persiguen determinar y localizar genes que permitan sentar las bases genéticas de la evolución de los homínidos (Enard y col., 2002; Cáceres y col., 2003). Y es que, a pesar de que la evolución del género *Homo* está asociada con la aparición y desaparición de abundantes rasgos característicos, la primera diferencia genética con consecuencias funcionales entre el hombre y el resto de los primates ha sido recientemente descrita. Se trata de la inactivación de un gen que codifica la proteína MYH16 (miosina de cadena pesada 16) y que impide la acumulación de esta proteína en los sarcómeros conduciendo a la reducción de la presencia de músculo esquelético. Este gen concreto se expresa en los músculos de la mandíbula de todos los primates excepto el hombre. Y por tanto esta mutación es candidata a haber sido determinante en la evolución del cráneo en el género *Homo* (Currie, 2004). Este descubrimiento sin dejar de ser de un gran interés, nos permite emplazar el temprano momento científico en que realmente aún nos encontramos. También es digno de destacar que, a pesar del citado interés del hombre por su posición entre los grandes primates, estas especies se encuentran en una posición poco ventajosa, tanto desde el punto de vista científico como desde su propia supervivencia. Se ha propuesto desde la comunidad científica la creación de un *proyecto para el estudio de la evolución del genoma humano* (Human Genome Evolution Project), para poder comparar los genomas de los primates y alcanzar una mejor comprensión de los procesos evolutivos que llevaron a la aparición de las distintas especies (McConkey y Goodman, 1987; McConkey y col., 2000). Cabe además subrayar que, muchas especies de primates, y en concreto todos los grandes simios, son especies gravemente amenazadas y en riesgo de extinción. Por tanto un problema adicional a la hora de estudiar los grandes simios africanos son las dificultades que plantea la obtención de muestras. Valga como ejemplo no sólo el trabajo aquí presentado, sino también la secuenciación del cromosoma 22 del Chimpancé y el estudio comparativo con su equivalente en el hombre (el cromosoma 21), llevado a cabo en su mayoría con tan sólo un ejemplar de chimpancé, y teniendo que refugiarse en presunciones con respecto a los polimorfismos existentes entre los

individuos de esta especie (The International Chimpanzee Chromosome 22 Consortium, 2004).

La aproximación a la reconstrucción de la evolución de los primates requiere todavía un gran esfuerzo y además exige la contribución de estudios de diversas disciplinas científicas como son la paleontología y la genética, y dentro de ésta todas sus vertientes. A pesar de todo, la unión de todos los esfuerzos nunca será capaz de paliar el mayor de todos los inconvenientes al que se enfrenta la reconstrucción de los eventos evolutivos, y es que las conclusiones, si bien informativas, no son verificables experimentalmente porque el proceso es irrepetible, una obviedad que siempre conviene tener presente.

### **6.5 Aplicación de la W-CGH para la localización y caracterización de Lugares Lábil Alkalinos (LLA)**

La comparación de los resultados obtenidos en los experimentos de W-CGH sobre linfocitos desnaturalizados con formamida (W-CGH *estándar*), frente a los observados empleando las mismas SHs sobre células incluídas en microgeles y sometidas a desnaturalización alcalina (DBD-W-CGH), nos permite caracterizar y descubrir diferencias en la presencia, abundancia y distribución de Lugares Lábil Alkalinos (LLAs). No se trata sólo de la localización de contrastes entre especies, sino también entre tipos celulares dentro de un mismo individuo y entre distintas familias de secuencias de ADN altamente repetidas.

Los LLAs son regiones particulares del ADN que presentan daños en las desoxirribosas que se ponen de manifiesto mediante la desnaturalización alcalina, ya que ésta genera ADN de cadena sencilla (ADNss), susceptible de ser hibridado, al romper los enlaces azúcar-fosfato defectuosos. Cabe destacar que esta misma desnaturalización también genera ADNss en aquellos lugares en que existen roturas naturales del ADN, aunque la presencia de éstas es relativamente pequeña comparada con la abundancia de LLAs.

Cuando se comparan los genomas de cerdos de las razas Ibérica (I) y Landrace/Large White (L) mediante la SH: I-R/L-G, los resultados obtenidos son distintos en los distintos tipos celulares hibridados. Sobre linfocitos fijados en carnoy y desnaturalizados con formamida, los brazos cromosómicos y las regiones de heterocromatina de los cromosomas acrocéntricos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) (Figs. 6, 7 y 39a). Mientras que las regiones de heterocromatina del subgenoma metacéntrico, así como el cromosoma X, muestran fluorescencia predominante en R (de I-R) (Figs. 6b', 7 y 39a-b), y el *brazo q* del cromosoma Y una sucesión de fluorescencias G (distal) y R (proximal) (Figs. 6b', 7 y 39a). Sobre

linfocitos incluidos en microgeles y desnaturalizados en condiciones alcalinas, aparecen fuertes señales de fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G), y no parecen mostrar señal de hibridación en las regiones eucromáticas (Fig. 39c). Es decir toda la señal observada procede de las secuencias de las regiones centroméricas de los cromosomas del subgenoma acrocéntrico o de la eucromatina. Por tanto estas secuencias son las que presentan mayor abundancia de LLAs. Sobre espermatozoides apenas se observa señal de hibridación, tan sólo pequeñas señales amarillo-anaranjadas (R + G) (Fig. 39d), procedentes también de las mismas secuencias. En ninguno de los dos casos se observa fluorescencia predominantemente R, que es la que caracteriza a los ADNs repetidos del subgenoma metacéntrico, así como tampoco una señal con fluorescencias R y G contiguas que indicarían presencia de LLAs en el cromosoma Y.

Cuando se compara el genoma de un macho de oveja de la raza Assaf (AS) con el de un macho de raza Castellana (CA) mediante la SH: AS-R/CA-G sobre linfocitos desnaturalizados con formamida, los brazos cromosómicos muestran una fluorescencia amarillo-anaranjada procedente de la hibridación equimolar de ambos ADNs genómicos (R + G) (Fig. 39e). Mientras que la heterocromatina centromérica de los cromosomas metacéntricos muestra fluorescencia R, y las mismas regiones en cromosomas acrocéntricos muestran distintas fluorescencias entre las regiones proximal (predominante R; de AS-R) y distal (G de CA-G) del bloque de heterocromatina centromérica (Fig. 39e-f). Cuando la misma SH se aplica sobre linfocitos que han sufrido un proceso de desnaturalización en álcali, estos muestran señales de fluorescencia R y G contiguas (Fig. 39g) procedentes de las regiones centroméricas del subgenoma acrocéntrico. No se observa ninguna señal amarillo-anaranjada procedente de las mismas regiones del subgenoma metacéntrico ni de la eucromatina. En cualquier caso el número de señales es muy bajo, y por tanto la cantidad de LLAs en estas células es muy escasa. Sobre los espermatozoides se observan las mismas señales en G y R pero con una notable mayor abundancia y un mayor solpamiento (Fig. 39h). Por tanto en la oveja los LLAs parecen localizarse predominantemente en las regiones centroméricas de los cromosomas acrocéntricos.

En primer lugar estos resultados sugieren que los LLAs son una característica estructural que no muestra un patrón general de comportamiento entre organismos. En este caso particular se observa que en cerdo y oveja su representación es completamente distinta. Las LLAs en el cerdo, además de mucho más abundantes que en la oveja, parecen restringidas a una determinada familia de secuencias de ADN altamente repetidas, las presentes en el subgenoma acrocéntrico (Fig. 39a-d), de las que la familia Ac2 es la mejor descrita (Jantsch y col., 1990). Mientras que en la oveja las diferencias se extreman aún más en los espermatozoides, la oveja muestra una gran abundancia de LLAs, mientras que el cerdo apenas ofrece señal alguna (Fig. 39d,h). Aunque los espermatozoides del hombre y el ratón se han descrito como altamente sensibles a la desnaturalización alcalina debido a la abundancia de Lugares Lábil Alcalinos (LLAs) presentes (Rivero y col., 2001), éste no parece ser el caso en los espermatozoides de

cerdo ni, por tanto, una situación generalizada. Este hecho puede invitar a pensar en la ausencia de un modelo universal de organización de la cromatina en las células espermáticas. Es decir, la abundancia de estos LLAs resulta ser distinta tanto entre organismos como entre distintos tipos celulares dentro de un mismo organismo, lo cual no es sorprendente si uno de estos tipos celulares es el espermatozoide, como en este caso, ya que su particular forma de empaquetar la cromatina para obtener una condensación aproximadamente mayor que la de los cromosomas metafásicos (Ward y col., 1991), requiere incluso el reemplazamiento de las histonas por protaminas, en las que se establecen nuevos enlaces intramoleculares (Bedford y Calvin, 1974).

Notablemente, la W-CGH nos permite identificar cuáles son las secuencias que presentan LLAs, ya que es la comparación de los resultados obtenidos con los protocolos de DBD-W-CGH y W-CGH la que nos permite caracterizar las secuencias que muestran LLAs. Un simple protocolo de DBD-FISH con una sonda de ADN genómico simple, tan solo nos permite observar la abundancia relativa de LLAs, pero no alcanzaría a informar sobre el tipo de secuencia que los presenta (Fig. 38); es decir no aportaría resultados cualitativos. Además puede comprobarse como los LLAs tan sólo afectan a determinadas secuencias, es decir distintas familias muestran distintas sensibilidades, hecho que, teniendo en cuenta la naturaleza de la heterocromatina como material no codificante, no parece un acontecimiento inesperado, aunque sí destacable. Esta distinta frecuencia de LLAs en las distintas familias de ADNs repetidos ha sido ya descrita anteriormente en el genoma humano, en el que el satélite clásico de 5pb muestra numerosos LLAs frente al satélite-alfa, que muestra un número muy bajo de estos (Fernández y col., 2001b) probablemente debido, una vez más, a su funcionalidad.

De modo que se ofrece una nueva utilidad de la W-CGH para aportar información novedosa sobre una característica estructural. En este caso no se emplea para establecer diferencias en el número de copias de secuencias de ADN altamente repetidos entre dos individuos, sino para determinar y caracterizar los ADNs repetidos que presentan LLAs en el genoma. Además estos resultados nos invitan a reflexionar sobre la posible influencia de los LLAs en la evolución de de las secuencias de ADN altamente repetido donde como hemos observado se localizan en el caso estudiado. Es probable que surjan abundantes LLAs en el complejo proceso de empaquetamiento del ADN en el espermatozoide, y se subsanen en el proceso de reparación que tiene lugar en los pronúcleos antes de la fusión que da lugar al cigoto. Debido a sus características, una reparación deficiente de las secuencias de ADN altamente repetidas no supondría una desventaja selectiva para el individuo, en principio, y sí acelerará el proceso de evolución de éstas.

## 7 CONCLUSIONES

De carácter general:

i) La Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) es una herramienta eficaz para la comparación de genomas de organismos distintos. La técnica permite estudiar y comparar genomas de individuos tanto de la misma especie como de especies o géneros diferentes.

ii) La W-CGH permite descubrir diferencias entre dos genomas en las secuencias de ADN altamente repetidas que forman sus bloques de heterocromatina y ofrece información tanto sobre la *abundancia relativa* como sobre la *composición de secuencia* de este tipo de familias de ADN.

De carácter concreto:

iii) La W-CGH se presenta como una técnica eficaz para detectar polimorfismos entre distintos genomas humanos. Esta posibilidad abre un campo nuevo para la caracterización y diferenciación de individuos que vayan a actuar como donante y receptor en un trasplante de médula ósea (TMO). La combinación de W-CGH, Hibridación *in situ* Fluorescente y Análisis Digital de Imágenes, permite cuantificar de manera eficiente el grado de quimerismo post-TMO.

iv) La evolución de las especies promueve que determinadas familias de ADNs repetidos se mantengan de forma muy estable en genomas distintos mientras que otras son sustituidas en un tiempo evolutivo menor.

v) La W-CGH muestra patrones de diferenciación estables entre las secuencias de ADNs repetidos de los genomas de distintas razas de porcino. Los cerdos domésticos de las razas Duroc, Ibérico y Landrace/Large White presentan dinámicas distintas de *duplicación diferencial* en los ADNs repetidos presentes en las regiones centroméricas de los cromosomas del subgenoma metacéntrico, mientras que las secuencias equivalentes en el subgenoma acrocéntrico no muestran este tipo de diferencias. El bloque de heterocromatina del cromosoma Y presenta dos familias de secuencias de ADN altamente repetidas con una representación distinta en cada raza.

vi) La comparación de los genomas de los roedores de las especies *Microtus cabreræ* y *Microtus nivalis* revela diferencias entre estas especies en las familias de ADNs repetidos que forman los bloques de heterocromatina centromérica de todos los



cromosomas. Asimismo, las secuencias MSAT-160 de una y otra especie tampoco muestran hibridación cruzada entre ambas. Sin embargo, esta secuencia forma parte de los bloques de heterocromatina de todos los autosomas de *Microtus cabreræ* y *Microtus nivalis*, siendo su *representación relativa* mayor en la heterocromatina de *Microtus nivalis* que en la de *Microtus cabreræ*.

vii) Los saltamontes de las especies *Arcyptera tornosi* y *Arcyptera fusca* muestran dos familias de ADN's repetidos formando los bloques de heterocromatina distal de los centrómeros de todos sus cromosomas. Estas familias se encuentran presentes en ambas especies pero muestran distinta *abundancias relativa* en cada genoma. La familia denominada CAT-1 está más representada en *Arcyptera tornosi*, mientras que DAF-1 es más abundante en *Arcyptera fusca*. Asimismo, estas familias muestran distintos patrones de condensación entre ellas.

viii) La W-CGH muestra que las familias de secuencias de ADN altamente repetidas son las que introducen mayores diferencias cualitativas y cuantitativas entre los genomas de los primates. De esta forma, las secuencias de ADN altamente repetidas de chimpancé, gorila y mono verde resultan muy divergentes cuando se comparan con las equivalentes en humano. Tan sólo existen ciertas excepciones, como el satélite-alfa del cromosoma 1 y las secuencias de la región centromérica del cromosoma 9 humano, que han mantenido cierto grado homología cuando se compara el genoma del hombre con el del chimpancé o el del gorila.

ix) La presencia de Lugares Lábil Alkalinos (LLAs) no se debería considerar como una condición estructural ligada al genoma de las especies, sino al tipo celular de cada especie. La W-CGH nos permite revelar que, en el caso del cerdo doméstico los LLAs aparecen localizados en los ADN's repetidos del subgenoma acrocéntrico o en la eucromatina, y presentan mayor abundancia en los linfocitos que en los espermatozoides. En el caso de la oveja los LLAs también se localizan predominantemente en los ADN's repetidos del subgenoma acrocéntrico, sin embargo, en este caso estos muestran una mayor abundancia en los espermatozoides que en los linfocitos.

x) Por todo ello, la W-CGH es una técnica susceptible de ofrecer resultados de muy diversa índole, y aplicables en campos tan diversos como la biomedicina, en aquellos relacionados con características estructurales de los genomas, o bien con la evolución y transformación de los contenidos genéticos que determinan la diferenciación entre las especies.

## **TABLAS**

## 8 TABLAS

**Tabla 1**

<b>9CC</b>	<b>RANGO G/B</b>	<b>MEDIA G/B</b>
9CC-M	0,0018-0,0097	0,00486 ± 0,00284
9CC-V	0,0004-0,0019	0,00126 ± 0,00055

**Valores del Código Celular de la región centromérica de los cromosomas 9-9' (9CC) de un varón (V) y una mujer (M).**

Se obtuvieron los valores de 9CC-M y 9CC-V a partir del cálculo de la relación G/B en imágenes de 50 células en interfase de cada uno de los individuos estudiados (M y V). Se muestra el rango de valores absolutos (RANGO G/B), así como la media y la desviación típica (MEDIA G/B).

**Tabla 2**

<b>Quimerismo</b>	<b>O-M</b>	<b>O-V</b>	<b>Desc,</b>	<b>E-M</b>	<b>E-V</b>	<b>CHI-2</b>
M1-V1- exp a	25	25	0	25	25	0,020
M2-V1- exp a	32	16	2	32	16	0,023
M3-V1- exp a	36	11	3	35,25	11,75	0,007
M1-V1- exp b	20	27	3	23,5	23,5	0,766
M2-V1- exp b	35	15	0	33,33	16,66	0,122
M3-V1- exp b	34	16	0	37,5	12,5	0,002
M1-V1- exp c	22	26	2	24	24	0,188
M2-V1- exp c	29	19	2	32	16	0,586
M3-V1- exp c	30	16	4	34,5	11,5	1,855

### **Resultados de tres experimentos de quimerismo artificial.**

En cada experimento (a, b y c) se recrearon tres grados de quimerismo artificial distintos: M1-V1 (mujer 1:varón 1), M2-V1 (mujer 2:varón 1) y M3-V1 (mujer 3:varón 1).

Se muestra el número de células observadas dentro de los intervalos 9CC-M (O-M) y 9CC-V (O-V). Los valores observados se comparan con el número de células esperadas para cada intervalo (E-M y E-V; células de mujer y varón, respectivamente). En ningún caso muestran diferencias significativas ( $\text{Chi-2} < 3,6$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

(Desc- número de células imposibles de asignar a un origen: O-M u O-V; exp-experimento).

**Tabla 3**

SH	SUBG ACRO	SUBG META	Y-PROX	Y-DIST
I-R/DU-G	R + G (R/G=0,918 ± 0,020)	R (de I-R) (R/G=1,556 ± 0,014)	R (de I-R)	R (de I-R)
I-G/DU-R	R + G (R/G=0,921 ± 0,067)	G (de I-G) (R/G=0,621 ± 0,034)	G (de I-G)	G (de I-G)
I-R/L-G	R + G (R/G=1,076 ± 0,049)	R (de I-R) (R/G=1,424 ± 0,002)	R (de I-R)	G (de L-R)
I-G/L-R	R + G (R/G=0,911 ± 0,074)	G (de I-G) (R/G=0,751 ± 0,044)	G (de I-G)	R (de L-G)
L-R/DU-G	R + G (R/G=1,054 ± 0,010)	R (de L-R) (R/G=1,395 ± 0,107)	R (de L-R)	R (de L-R)
L-G/DU-R	R + G (R/G=0,837 ± 0,095)	G (de L-G) (R/G=0,781 ± 0,042)	G (de L-G)	G (de L-G)

**Resultados de la comparación de tres razas de cerdo doméstico (*Sus domesticus*) mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

Se muestran los resultados de la comparación de los genomas de individuos de razas Duroc (DU), Ibérica (I) y Landrace/Large White (L) mediante distintas Sondas Híbridas (SH) y revelados en rojo (R) o verde (G).

También se muestra la fluorescencia predominante R y/o G observada en las preparaciones. Concretamente en las regiones centroméricas de los subgenomas acrocéntricos (SUB ACRO), metacéntrico (SUB META) y en las regiones proximal (Y-PROX) y distal (Y-DIST) del brazo q del cromosoma Y. Así como la relación R/G obtenida en la medición de las regiones centroméricas de los subgenomas acrocéntricos y metacéntrico (media ± desviación típica).

**Tabla 4**

SH	CENT CAB	CENT NIV
CAB-R/NIV-G	R (de CAB-R) (R/G=6,813 $\pm$ 0,444)	G (de NIV-G) (G/R=4,071 $\pm$ 0,384)
CAB-G/NIV-R	G (de CAB-G)	R (de NIV-R)
CAB-R/NIV-G + MSAT-CAB-G	R>>G (R/G=3,487 $\pm$ 0,301)	G (de NIV-G)
CAB-R/NIV-G + MSAT-CAB-R	R (de CAB-R)	G (de NIV-G)
CAB-R/NIV-G + MSAT-NIV-R	R (de CAB-R)	R>G (G/R=1,332 $\pm$ 0,050)
CAB-R/NIV-G + MSAT-NIV-G	R (de CAB-R)	G (de NIV-G)

**Tabla resumen de los resultados obtenidos en los estudios de W-CGH con el género *Microtus*.**

Se compararon los genomas de dos especies: *Microtus cabrae* (CAB) y *Microtus nivalis* (NIV) y se estudió la localización de la secuencia MSAT-160 procedente de los genomas de CAB (MSAT-CAB) y NIV (MSAT-NIV). Los genomas y las secuencias se marcaron de modo que pudiesen ser reveladas en rojo (R) y en verde (G), alternativamente.

Se muestran las fluorescencias obtenidas sobre las regiones centroméricas de CAB (CENT CAB) y de NIV (CENT NIV) y los valores de la media y desviación típica de la relación R/G. Así como las fluorescencias observadas sobre los cromosomas sexuales (SEXUALES CAB y SEXUALES NIV).

**Tabla 5**

SH	IC	NoIC
V2-G/V2-R	0,9926 $\pm$ 0,025 (99%)	0,0074 $\pm$ 0,025 (1%)
V2-G/M2-R	0,8579 $\pm$ 0,037 (86%)	0,1421 $\pm$ 0,037 (14%)
V2-G/M2-R*	0,8656 $\pm$ 0,033 (87%)	0,1344 $\pm$ 0,033 (13%)
V2-G/CH-R	0,7475 $\pm$ 0,029 (75%)	0,2525 $\pm$ 0,029 (25%)
V2-G/GO-R	0,7790 $\pm$ 0,03 (78%)	0,2210 $\pm$ 0,038 (22%)
V2-G/MV-R	0,7056 $\pm$ 0,035 (71%)	0,2944 $\pm$ 0,035 (29%)

**Tabla resumen la Identidad Citogenética (IC) estimada a partir de los experimentos de Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) con genomas de primates.**

Se comparó el genoma de un varón (V2) con los de una mujer (M2), un chimpancé (CH), un gorila (GO) y un mono verde (MV) mediante W-CGH. Los resultados se obtuvieron sobre el genoma de V2 (*genoma referencia*), excepto en (\*), que se empleó el de M2.

Se muestran los distintos valores de media, desviación típica y porcentaje de IC y NoIC para cada pareja de genomas comparados mediante distintas Sondas Híbridas (SHs).

(R- rojo; G- verde).

## **FIGURAS**

### **Figura 1**

#### **La organización del genoma humano.**

Cuadro resumen de las secuencias que lo componen y de su representación aproximada.

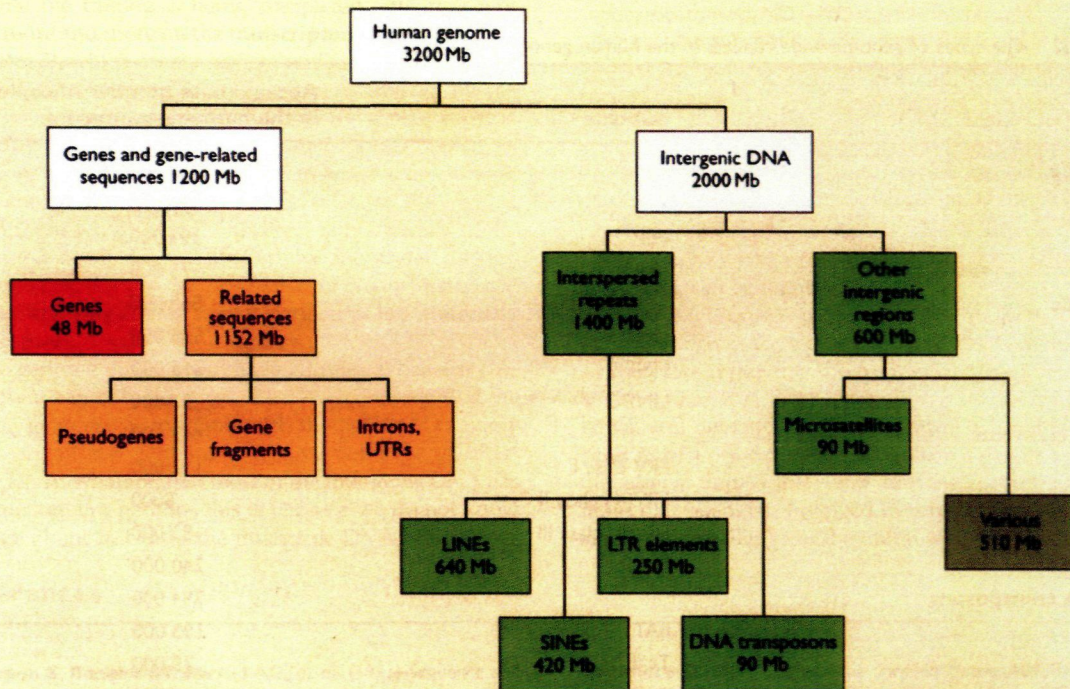
### **Figura 2**

#### **ADN satélite centromérico en el genoma humano**

Cuadro resumen de las distintas familias de ADNsat presentes en el genoma humano (*nombre*), con su tamaño y localización.



### Box 1.4: The organization of the human genome



Based on IHGSC (2001) and Venter et al. (2001).

Extraído de Brown TS. Genomes 2nd Ed. 2002.

Tamaño (pb)	Nombre	Localización
5	2 + 3	Mayoría de los cromosomas, posiblemente todos
42	1	Mayoría de los cromosomas
48	--	21, 22 Y, posiblemente otros cromosomas
68	beta	1, 9, Acrocéntricos e Y
171	alfa	Todos los cromosomas
220	gamma	8, X

Extraído de Tyler-Smith y Willard. 1993.

### **Figura 3**

**Imágenes de distintas Hibridaciones Genómicas Comparativas-Completas (W-CGHs) realizadas con genomas y sobre metafases de hombre (*Homo sapiens*).**

Se observa fluorescencia amarillo-anaranjada en todos los brazos cromosómicos (en *a* y *a'* se encuentra apantallada bajo la fluorescencia azul –B– del DAPI), así como en abundantes regiones de heterocromatina centromérica. Otras regiones centroméricas muestran fluorescencia predominante roja (R) o verde (G), especialmente los cromosomas acrocéntricos (*flechas azules* y *d*) y los cromosomas 1 (*flechas rojas* y *g*), 9 (*flechas blancas*), 16 (*flechas amarillas*) e Y (*flechas verdes*, *e* y *f*).

**a-a')** El genoma de un varón revelado en R se compara con el de una mujer en G sobre una metafase de varón. En (**a**) los cromosomas se encuentran contrateñidos con DAPI. Nótese la fluorescencia R (procedente del genoma del varón) predominante en el cromosoma Y (*flecha verde*).

**b-b')** El genoma de un varón revelado en G se compara con el de una mujer en R sobre una metafase de varón. En (**b**) los cromosomas se encuentran contrateñidos con DAPI. Nótese la fluorescencia G predominante en el cromosoma Y (*flecha verde*) y la intensidad de fluorescencia de todo el cromosoma 19 (*flecha azul*).

**c)** Detalle de un cromosoma 1 mostrando fluorescencia predominante G en la familia de satélite-alfa y R en la familia de satélite clásico II.

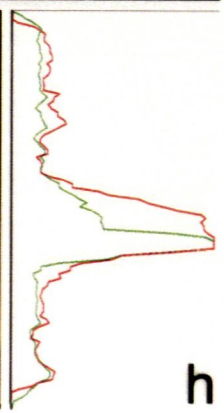
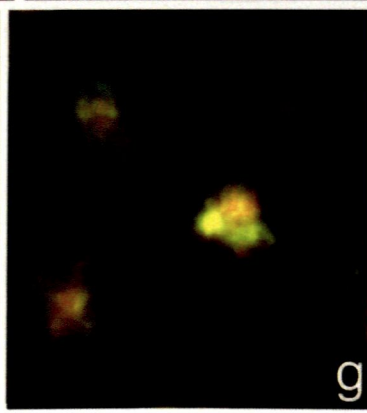
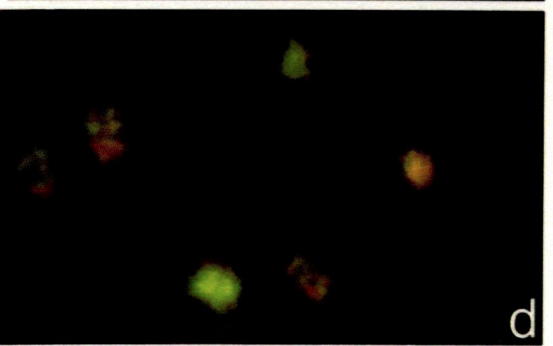
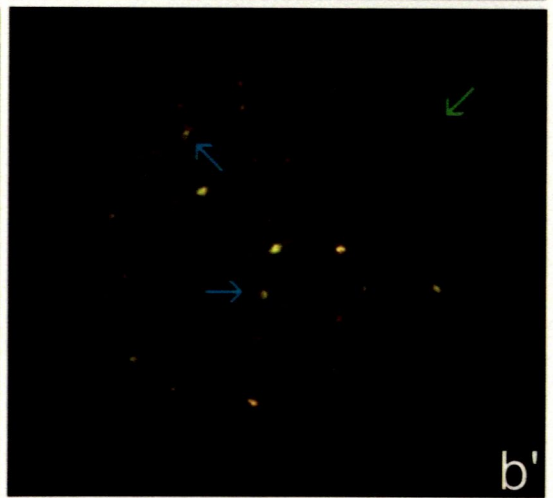
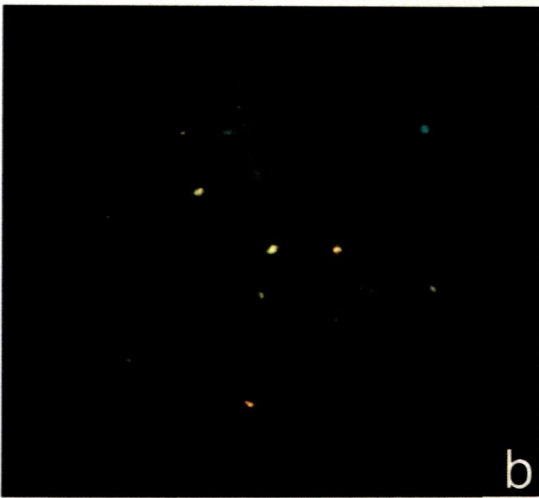
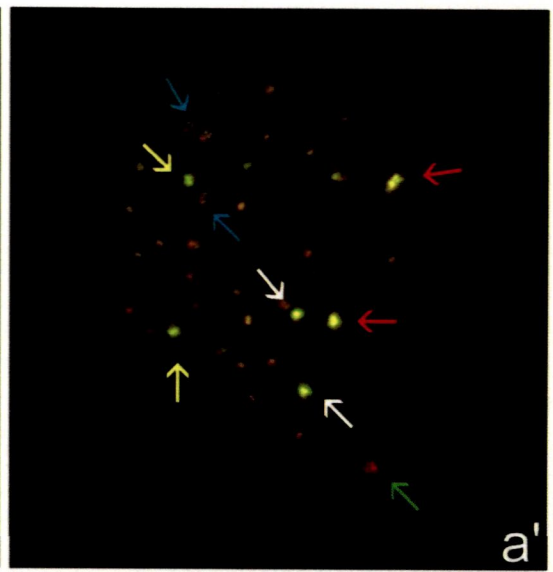
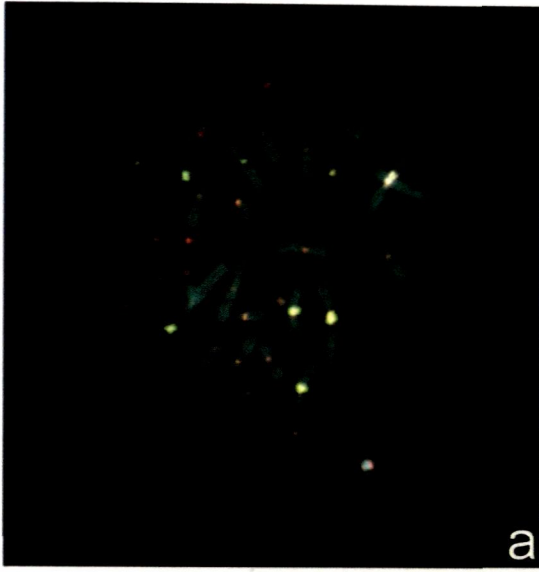
**d)** Detalle de diversos cromosomas mostrando fluorescencias predominantes R o G en las regiones de heterocromatina centromérica.

**e-f)** Detalle de los cromosomas Y de las figuras (**a-a'**) y (**b-b'**), respectivamente.

**g)** Detalle del cromosoma 1 mostrando predominancia R en la familia de satélite-alfa y G en la familia de satélite clásico II.

**h)** Perfil longitudinal de las fluorescencias R y G del cromosoma 1 mostrado en (**g**).





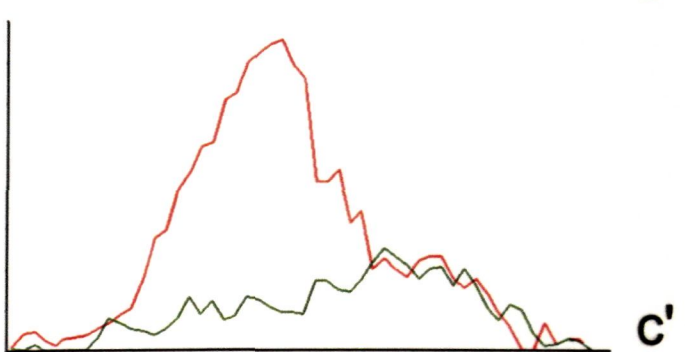
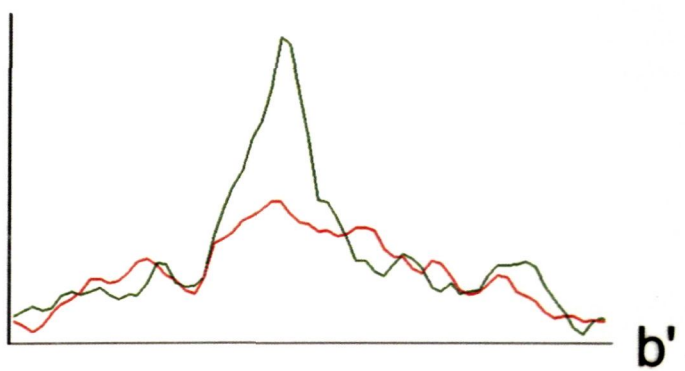
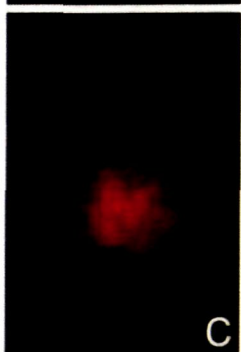
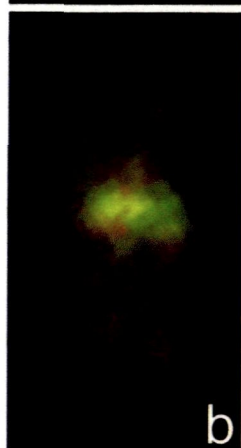
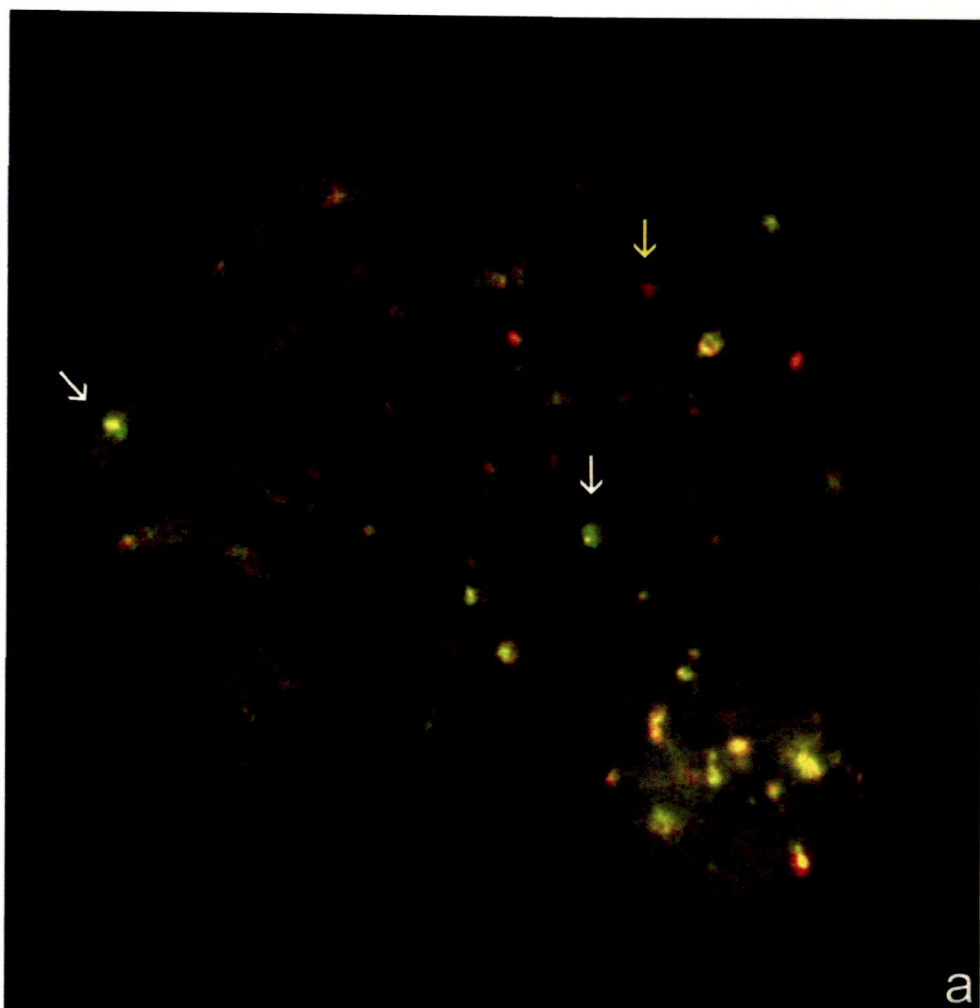
#### **Figura 4**

##### **Resultados de un experimento de Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) entre los genomas de una mujer (M) y de un varón (V).**

El genoma de M se marcó de modo que pudiera ser revelado en G, y el genoma de V en R. La Sonda Híbrida resultante (M-G/V-R) se hibridó sobre linfocitos de V.

**a)** Metafase donde los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) mientras que ciertas regiones de heterocromatina centromérica fluorescencia R o G predominante, concretamente los cromosomas 1, 9 (*flechas blancas*), 15, 16 e Y (*flecha amarilla*).

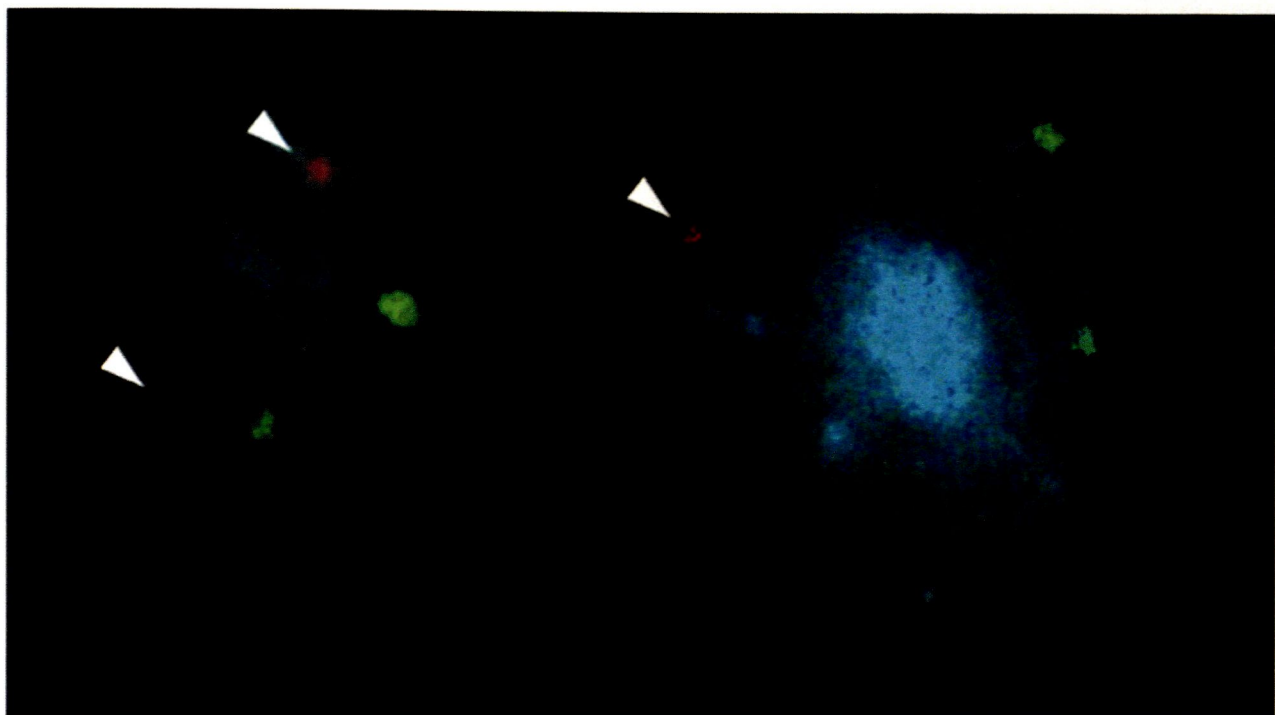
Se muestran en detalle los cromosomas 9 (**b**) e Y (**c**) junto con una muestra de sus perfiles longitudinales (**b'** y **c'**, respectivamente) en los que se delinean las cantidades de fluorescencias R y G. Estos dos cromosomas son los que muestran los polimorfismos más grandes entre estos dos individuos en sus regiones centroméricas, siendo la fluorescencia predominantemente G (procedente de M) en el cromosoma 9 (ver pico de G en **b'**), y R (de V) en el Y (ver pico de R en **c'**).



### **Figura 5**

#### **FISH doble sobre linfocitos de una mujer (M) (izquierda) y de un varón (V).**

Se empleó una sonda específica del satélite clásico III del cromosoma 9 revelada en verde (G), y otra del satélite-alfa del cromosoma X, en rojo (R) (*flechas*). El núcleo interfásico está contrateñido con DAPI, en azul (B). La fluorescencia G se emplea para estimar el tamaño de las regiones centroméricas del cromosoma 9 al contrastarlo con la fluorescencia B del total del núcleo, mediante la relación G/B.





### **Figura 6**

**Cromosomas de cerdo (*Sus domesticus*) (y perfiles longitudinales de fluorescencia) representativos de los resultados obtenidos en cada subgenoma (acrocéntrico y metacéntrico) y en el cromosoma Y, mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

Cromosomas extraídos de los distintos experimentos de W-CGH realizados comparando los genomas de individuos de las razas Duroc (DU), Ibérica (I) y Landrace/Large White (L). Los brazos de todos los cromosomas muestran fluorescencia amarillo-anaranjada apantallada bajo la fluorescencia azul (B) de la contratinción con DAPI.

La columna *I-R/DU-G* muestra la comparación de los genomas de I revelado en rojo (R) y de DU en verde (G), sobre linfocitos de I. La región de heterocromatina centromérica de los cromosomas acrocéntricos (a) muestra fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) y la de los cromosomas metacéntricos (a') y el cromosoma Y (a'') muestran fluorescencia predominante R (procedente de I-R).

La columna *I-R/L-G* muestra la comparación de los genomas de I revelado en R y de L en G, sobre linfocitos de L. La región de heterocromatina centromérica de los cromosomas acrocéntricos (b) muestra fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) y la de los cromosomas metacéntricos (b') muestra fluorescencia predominante R (procedente de I-R). El cromosoma Y (b'') muestra dos regiones discretas de hibridación, la región proximal muestra fluorescencia predominante G (de L-G) y la distal R (de I-R).

La columna *L-R/DU-G* muestra la comparación de los genomas de L revelado en R y de DU en G, sobre linfocitos de DU. La región centromérica de los cromosomas acrocéntricos (c) muestra fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) y la de los cromosomas metacéntricos (c') y el cromosoma Y (c'') muestran fluorescencia predominante R (procedente de L-R).

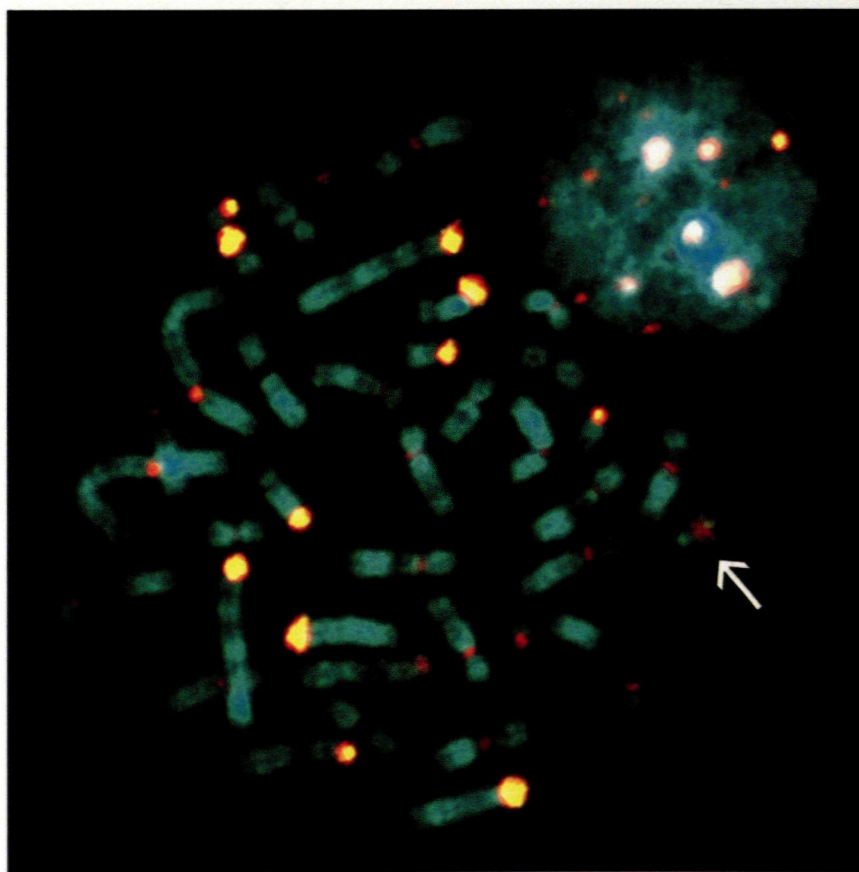
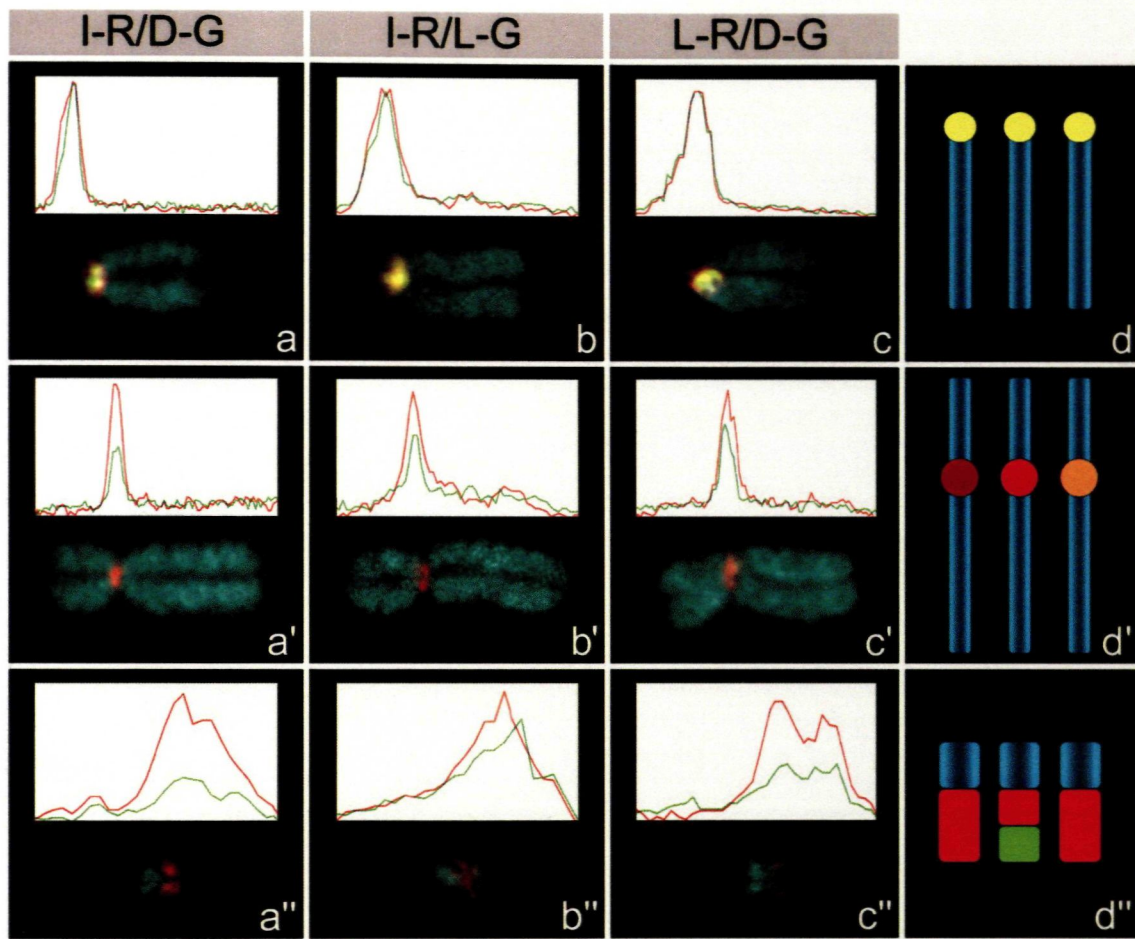
La columna de la derecha resume los resultados de los tres experimentos anteriores mediante cromosomas esquemáticos (d-d'').

### **Figura 7**

**Metafase de Landrace/Large White sobre la que se han comparado los genomas de cerdos (*Sus domesticus*) de raza Ibérica (I) y Landrace/Large White (L) mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de I se marcó para ser revelado en rojo (R) y el de L en verde (G), y se compararon mediante la Sonda Híbrida: I-R/L-G. Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la fluorescencia azul de la contratinción con DAPI. Las regiones centroméricas del subgenoma acrocéntrico muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G), y las del subgenoma metacéntrico fluorescencia predominante R (de I-R). El cromosoma Y muestra dos regiones discretas de hibridación, la región proximal muestra fluorescencia predominante G (de L-G) y la distal R (de I-R) (*flecha*).





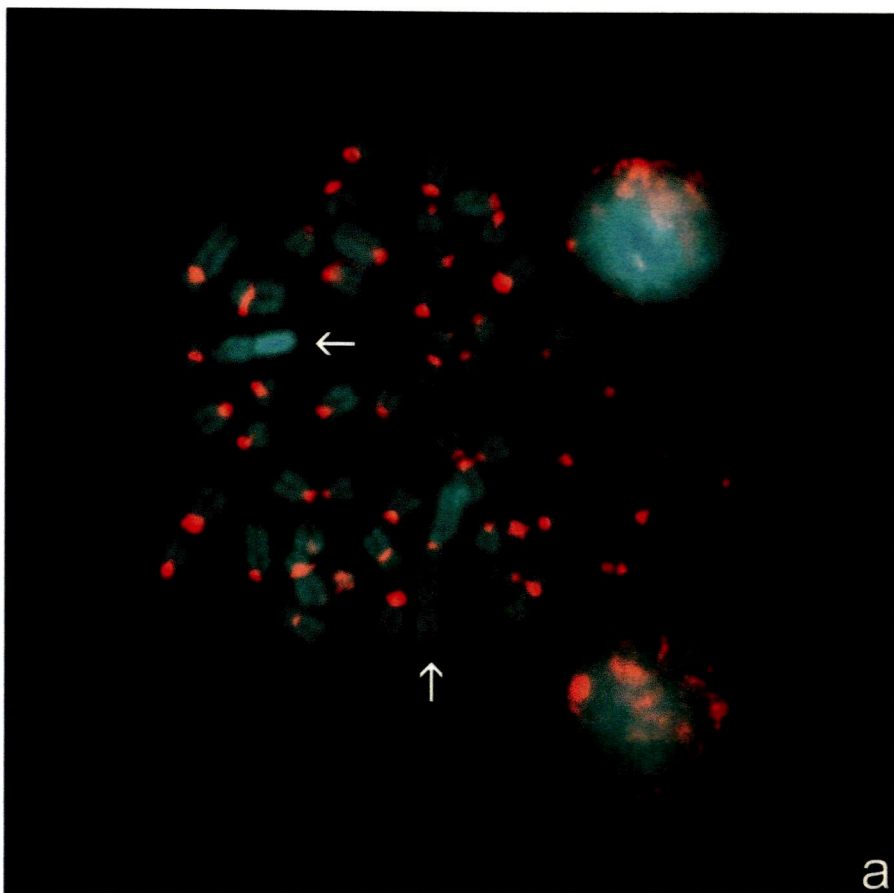
### **Figura 8**

**Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) de la secuencia MSAT-160 de *Microtus cabreræ* (CAB) sobre metafases de CAB y de *Microtus nivalis* (NIV).**

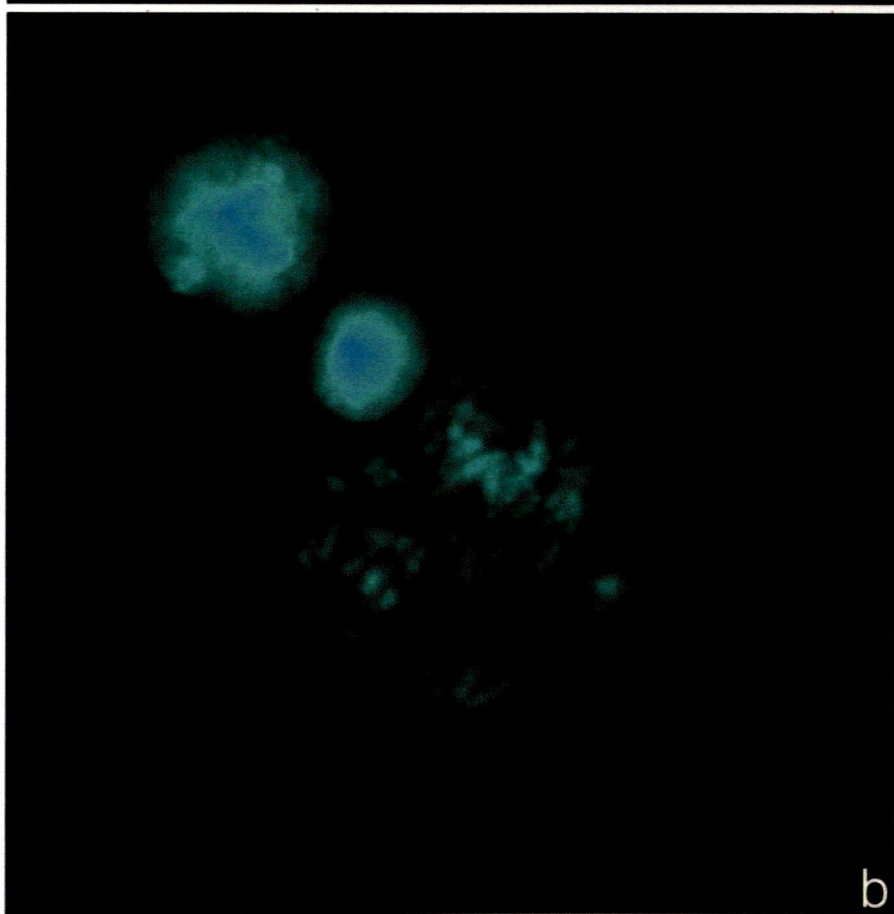
La secuencia MSAT-160 de CAB, marcada para ser revelada en rojo (R), se hibridó alternativamente sobre linfocitos de CAB (**a**) y NIV (**b**), mediante FISH.

**a)** Se observa hibridación en las regiones centroméricas de CAB, y ausencia de señal en los bloques de heterocromatina de los cromosomas sexuales, excepto en la región centromérica del cromosoma Y (*flechas*).

**b)** Sobre las regiones centroméricas de NIV no se observa señal de hibridación alguna.



a



b



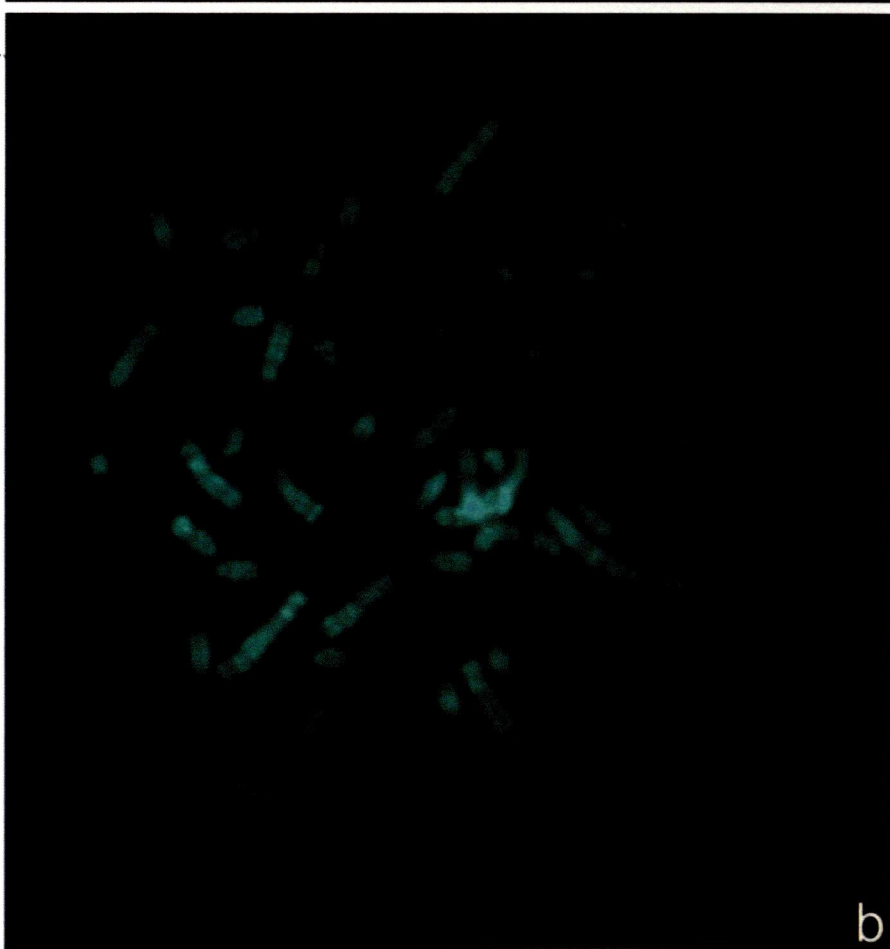
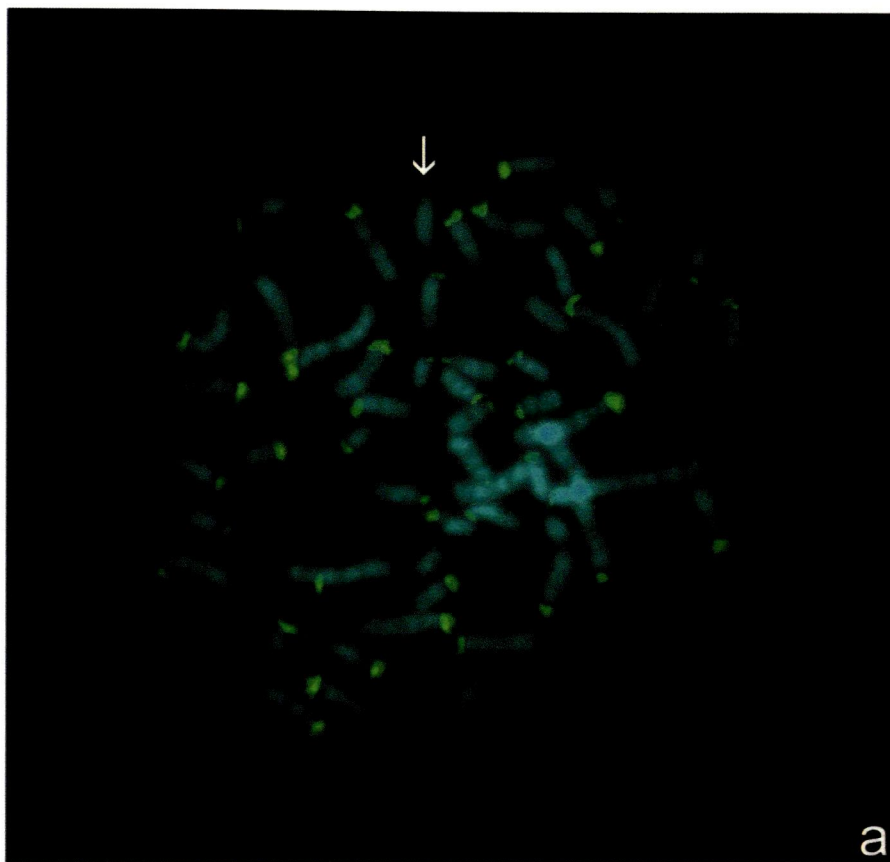
### **Figura 9**

**Hibridación in situ Fluorescente (FISH) de la secuencia MSAT-160 de *Microtus nivalis* (NIV) sobre metafases de NIV y de *Microtus cabreræ* (CAB).**

La secuencia MSAT-160 de NIV, marcada para ser revelada en G, se hibridó sobre linfocitos de NIV (**a**) y CAB (**b**), mediante FISH.

**a)** Se observa señal de hibridación exclusivamente en las regiones centroméricas de NIV, excepto en el cromosoma Y (*flecha*).

**b)** Sobre las regiones centroméricas de CAB no se observa señal de hibridación alguna.





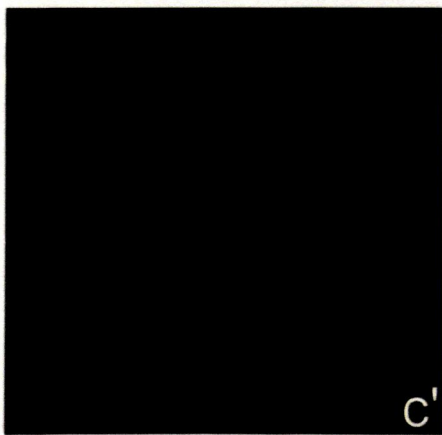
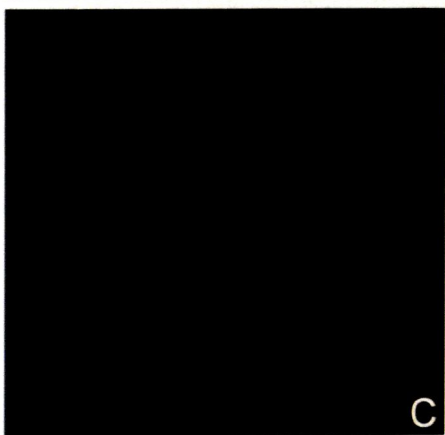
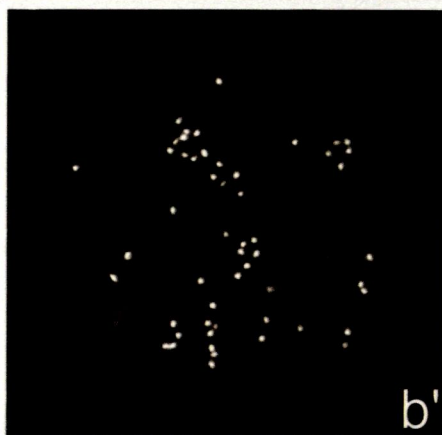
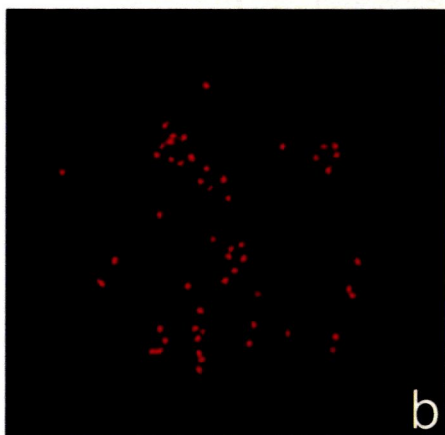
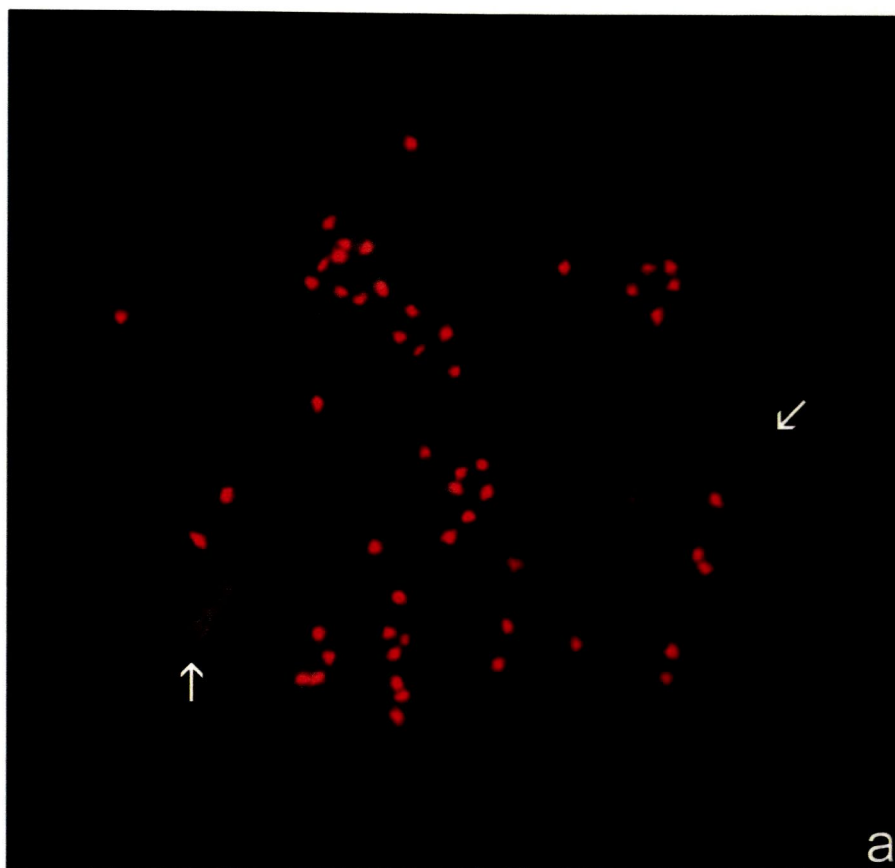
### **Figura 10**

**Metafase de *Microtus cabrae* (CAB) sobre la que se han comparado los genomas de CAB y *Microtus nivalis* (NIV) mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de CAB se marcó para ser revelado en rojo (R) y el de NIV en verde (G), mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G.

Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjado (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones de heterocromatina de los centromeros y de los cromosomas sexuales (*flechas*) muestran fluorescencia R (procedente de CAB-R). No se observa hibridación en G (de NIV-G) en estas regiones (**c-c'**).

**a)** imagen RGB; **b)** imagen RB; **b')** imagen R; **c)** imagen GB; **c')** imagen G.



### **Figura 11**

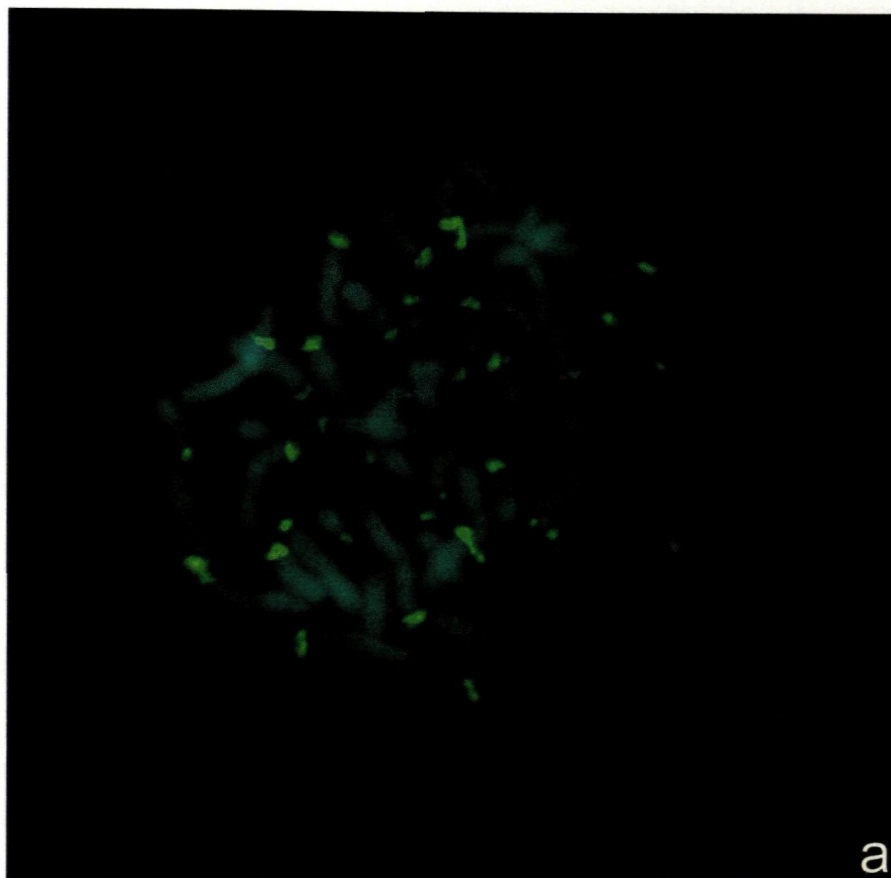
**Metafase de *Microtus nivalis* (NIV) sobre la que se han comparado los genomas de *Microtus cabreræ* y NIV mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de CAB se marcó para ser revelado en rojo (R) y el de NIV en verde (G), y se compararon mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G.

Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjado (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones heterocromáticas de los centromeros y del cromosoma Y (*flechas*) muestran fluorescencia G (procedente de NIV-G). No se observa hibridación en R (de CAB-R) en estas regiones (**b-b'**).

**a)** imagen RGB; **b)** imagen RB; **b')** imagen R; **c)** imagen GB; **c')** imagen G.





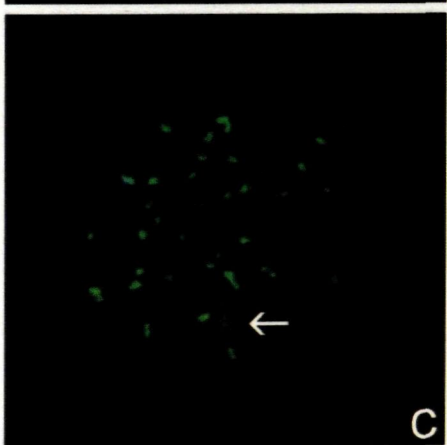
a



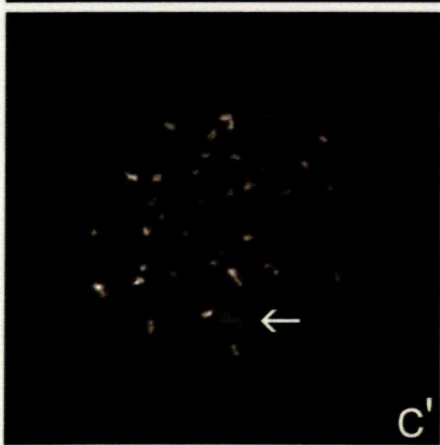
b



b'



c



c'

### **Figura 12**

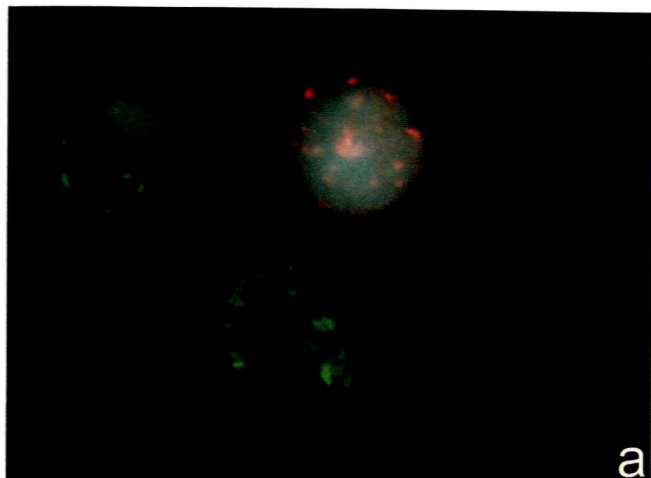
**Linfocitos de *Microtus cabreræ* (CAB) y *Microtus nivalis* (NIV) mezclados, sobre los que se han comparado los genomas de CAB y NIV mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de CAB se marcó para ser revelado en rojo (R) y el de NIV en verde (G), y se compararon mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G.

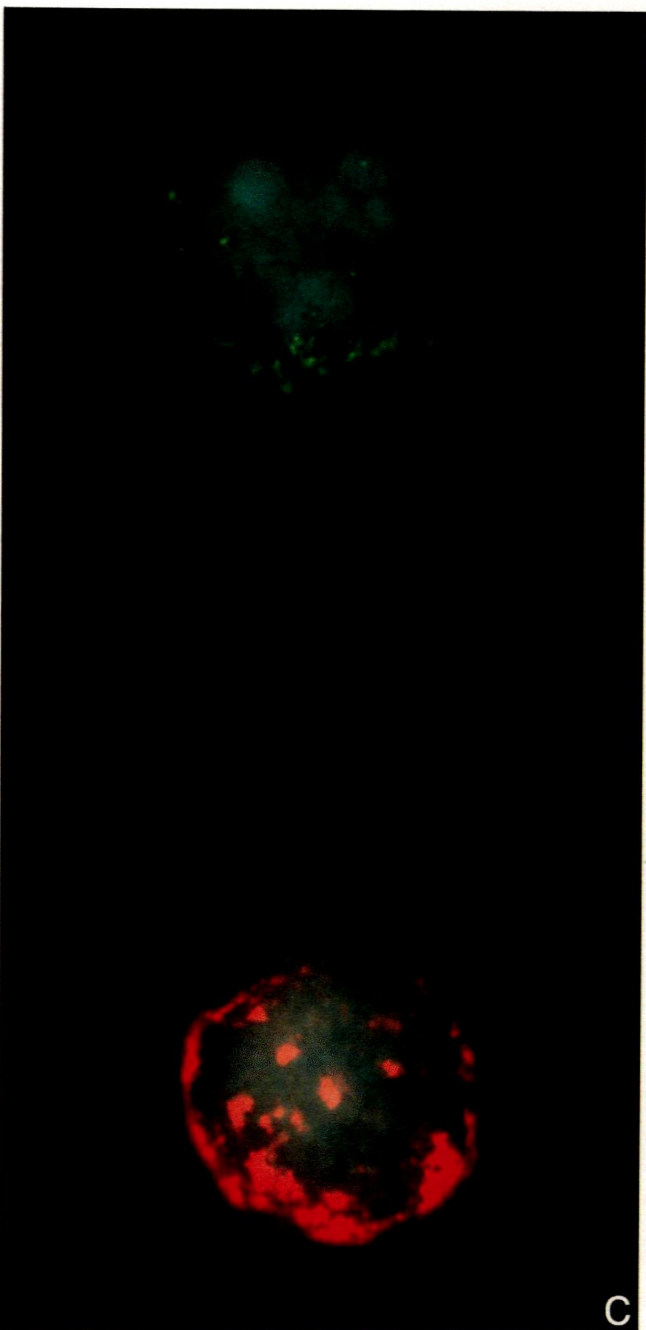
Los brazos cromosómicos y las regiones de eucromatina en las interfases muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul. Las regiones de heterocromatina muestran fluorescencia R en las células de CAB y fluorescencia G en las de NIV.

También se puede observar que las regiones centroméricas de CAB son ligeramente mayores que las de NIV.

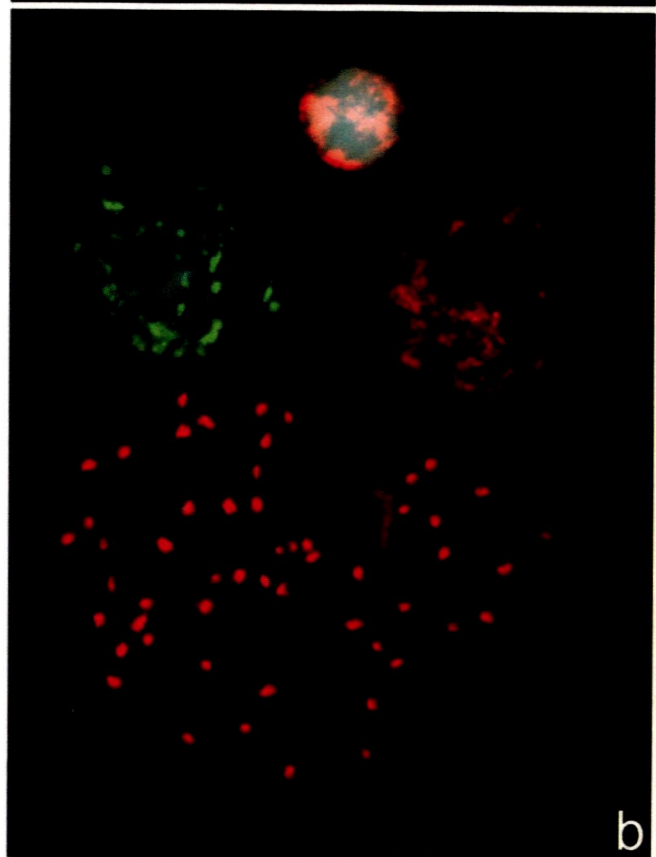
**a)** un linfocito de CAB (*arriba, derecha*) y tres de NIV; **b)** un linfocito de NIV (*izquierda*) y una metafase y dos linfocitos de CAB; **c)** un linfocito de NIV (*arriba*) y otro de CAB.



a



c

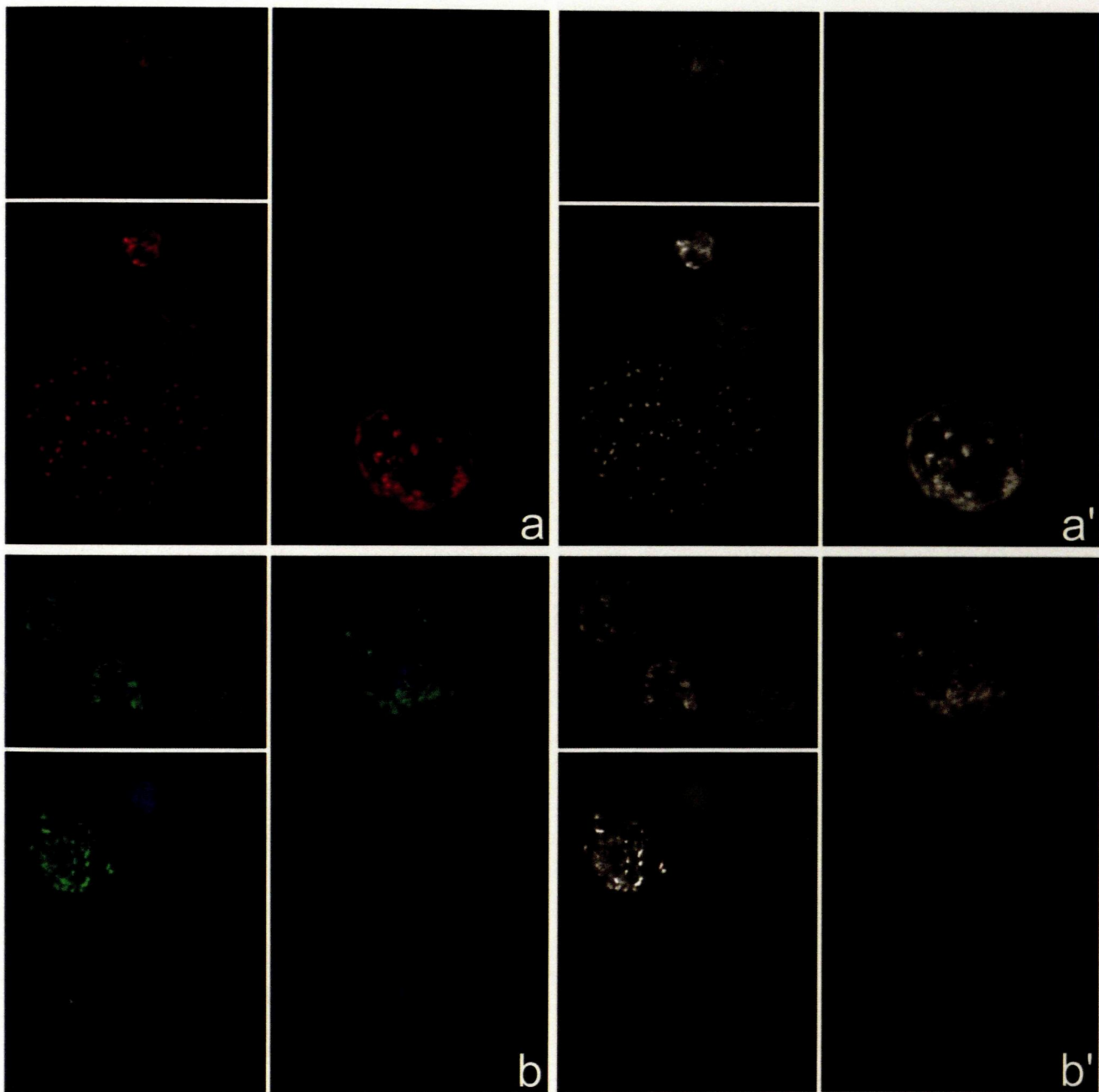


b

**Figura 13**

**Desglose por canales de fluorescencia roja (R), verde (G) y azul (B) de las imágenes de la Figura 12.**

**a) imagen RB; a') imagen R; b) imagen GB; b') imagen G.**





#### **Figura 14**

##### **Comparación de los resultados de dos experimentos distintos de Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) sobre metafases de *Microtus cabreræ* (CAB).**

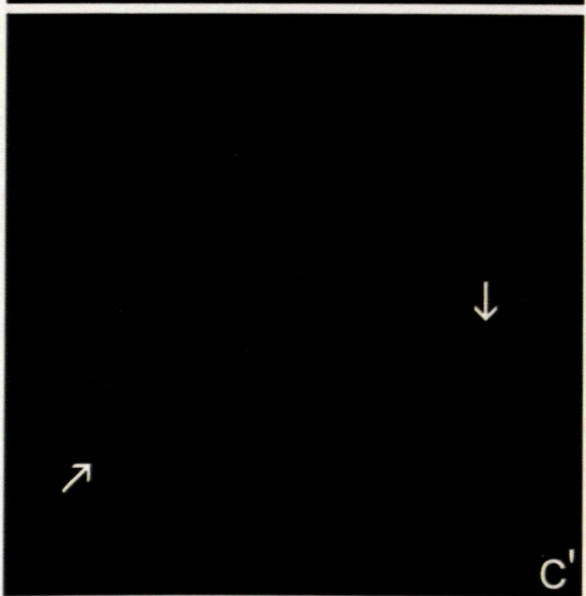
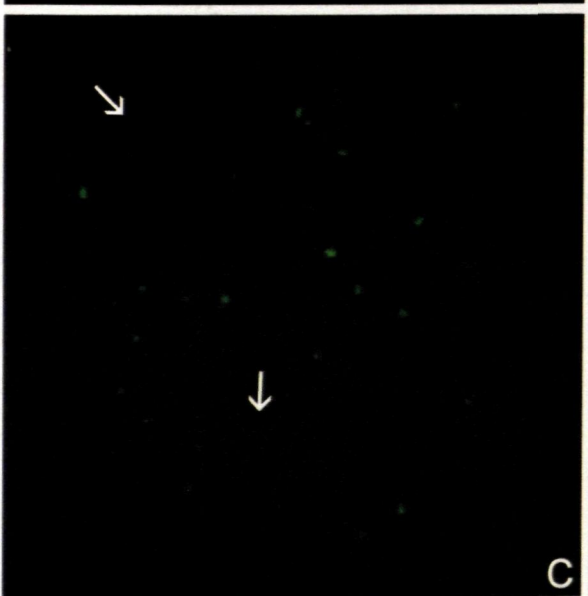
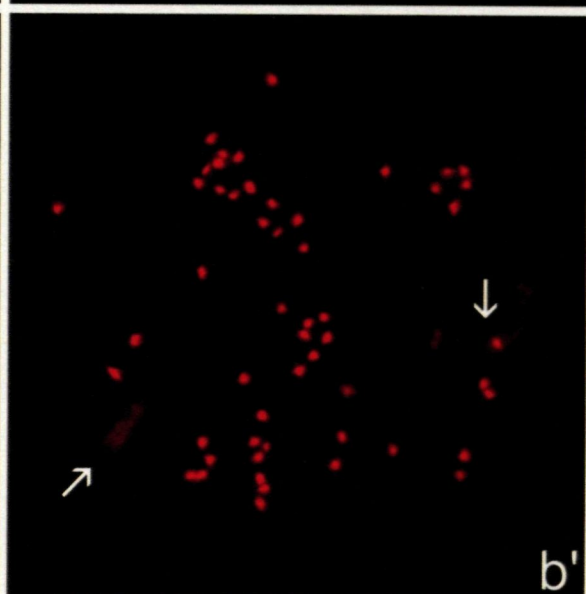
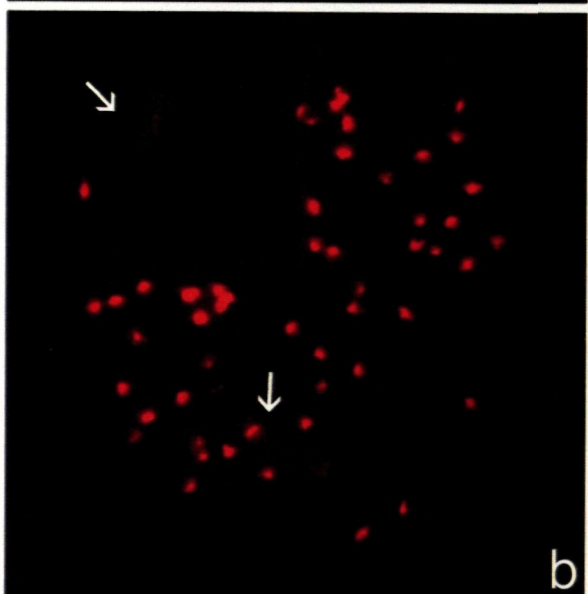
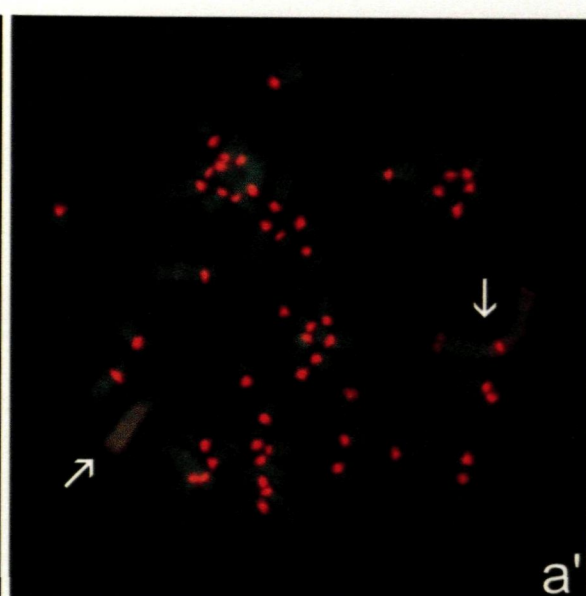
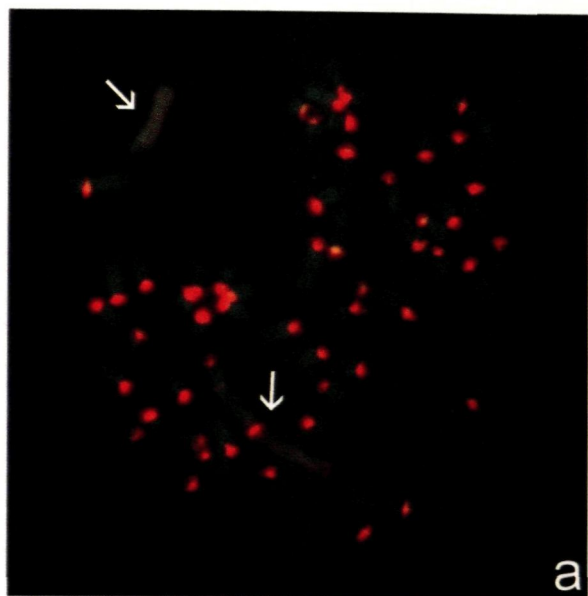
En la columna izquierda se observa una metafase de un linfocito de CAB sobre el que se han comparado los genomas de CAB (marcado para ser revelado en rojo –R–) y *Microtus nivalis* (en verde –G–) mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G, en presencia de la secuencia MSAT-160 de CAB en G (MSAT-CAB-G). Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones de heterocromatina de los centromeros y de los cromosomas sexuales (*flechas*) muestran fluorescencia R (procedente de CAB-R). Además se observa una leve señal de fluorescencia G (procedente de MSAT-CAB-G) en las regiones de heterocromatina centromérica. Pero presenta ausencia de señal en los bloques de heterocromatina de los cromosomas sexuales, excepto en la región centromérica del cromosoma Y (**c**).

En la columna derecha se observa el mismo experimento de W-CGH en ausencia de la secuencia MSAT-160 de CAB.

En (**c**) se observa una leve señal de fluorescencia G (procedente de MSAT-CAB-G) en las regiones centroméricas de CAB que no aparece en (**c'**).

Asimismo puede comprobarse que la fluorescencia R (de CAB-R en ambos casos) es muy intensa y muy semejante en ambos experimentos (compárense **b-b'**)

**a-a')** imágenes RGB; **b-b')** imágenes RB; **c-c')** imágenes GB.

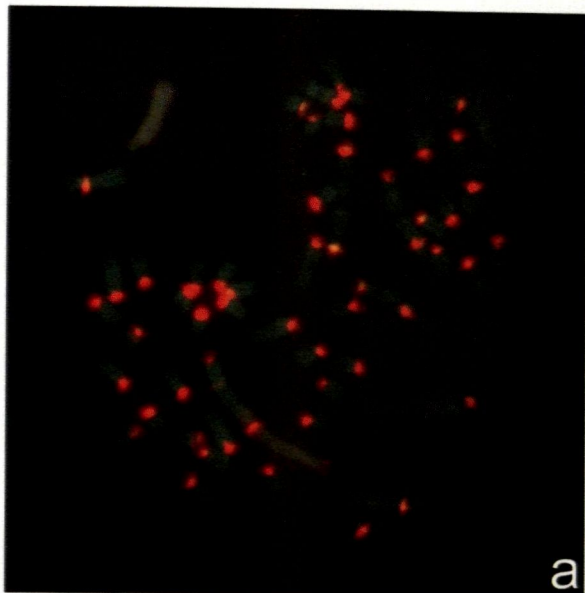


**Figura 15**

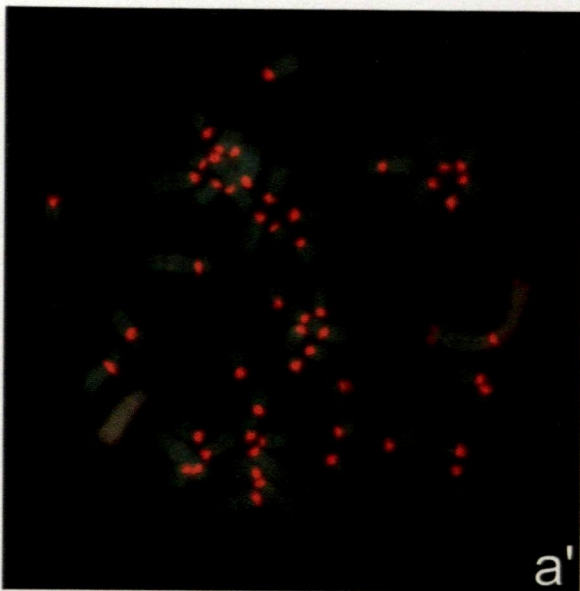
**Desglose por canales de fluorescencia roja (R), verde (G) de las imágenes de la Figura 14.**

**a-a')** imágenes RGB; **b-b')** imágenes R; **c-c')** imágenes G.

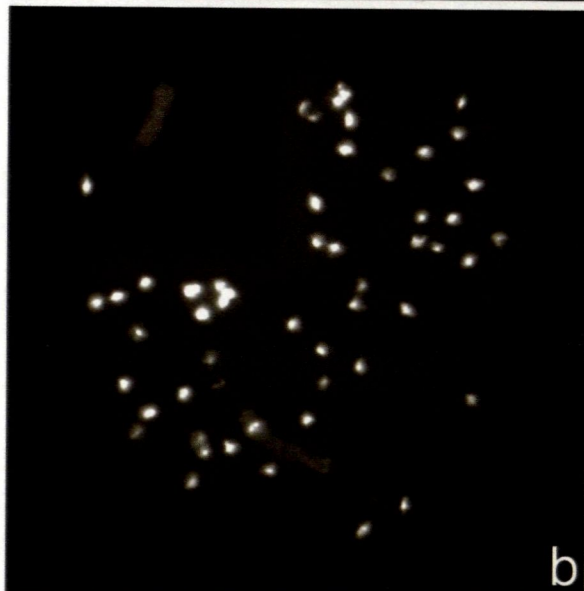




a



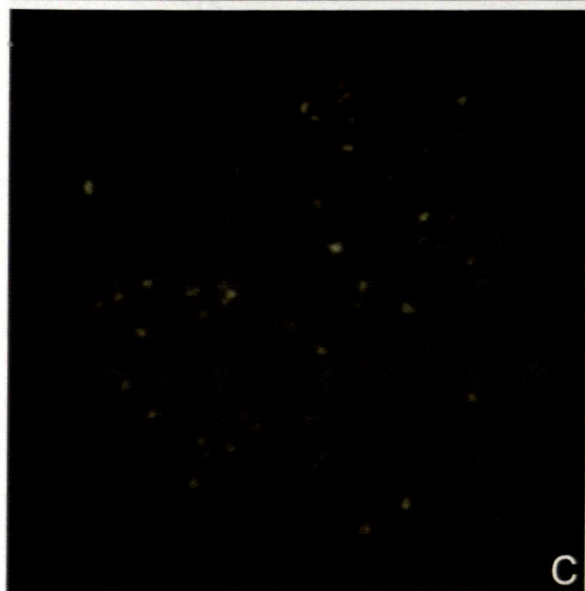
a'



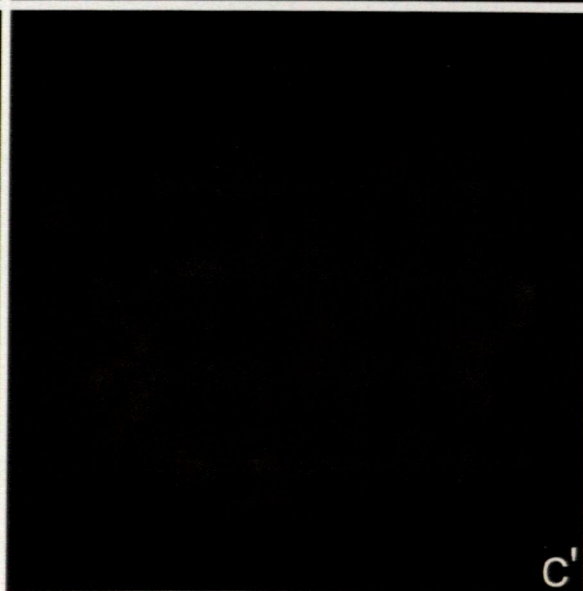
b



b'



c



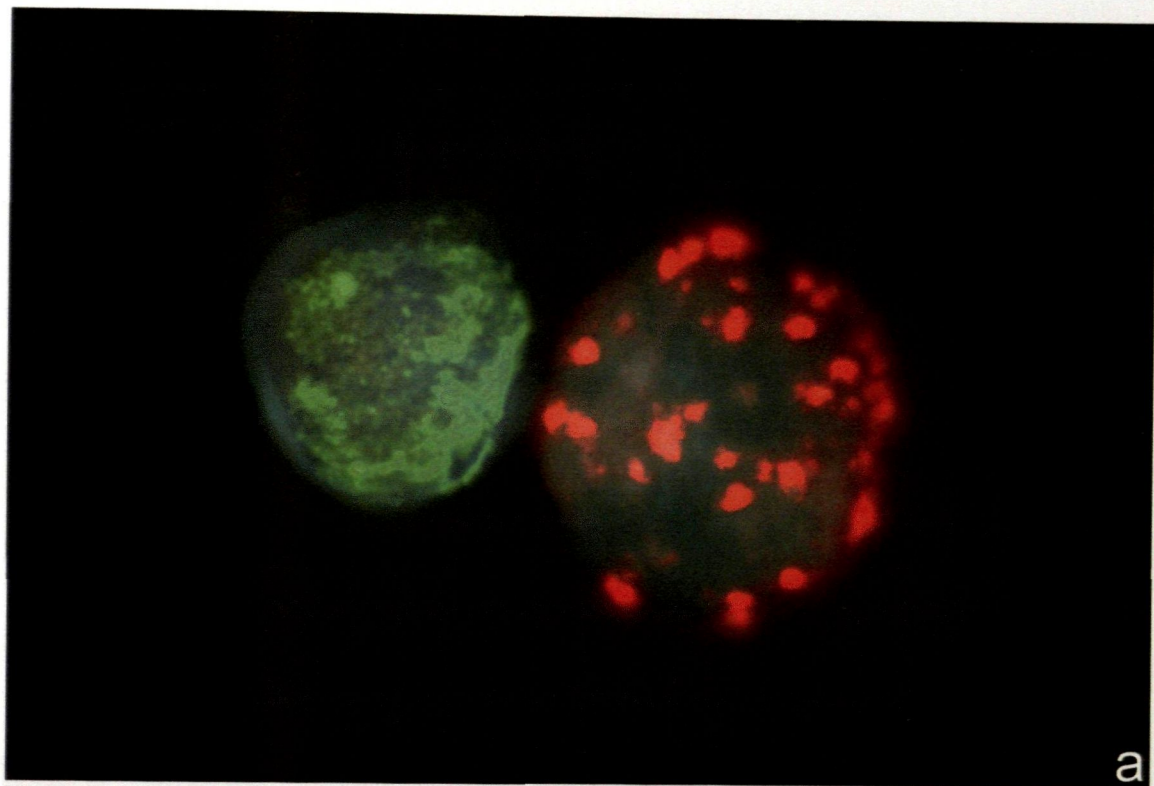
c'

### **Figura 16**

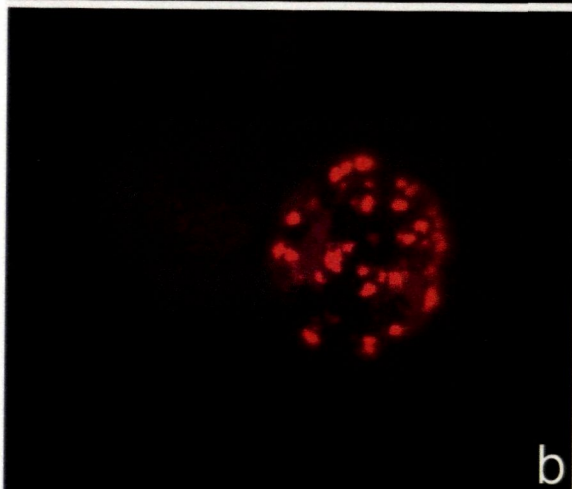
**Linfocitos de *Microtus cabreræ* (CAB) y *Microtus nivalis* (NIV) mezclados, sobre los que se han comparado los genomas de CAB y NIV mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) en presencia de la secuencia MSAT-160 de CAB.**

El genoma de CAB se marcó para ser revelado en rojo (R) y se comparó con el de NIV en verde (G) mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G, en presencia de la secuencia MSAT-160 de CAB en G (MSAT-CAB-G). Las regiones de eucromatina muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones de heterocromatina de NIV (*linfocito, izquierda*) muestran fluorescencia G (de NIV-G), mientras que las de CAB manifiestan una fluorescencia predominante R (procedente de CAB-R) y una leve señal G (de MSAT-CAB-G) (*flecha*).

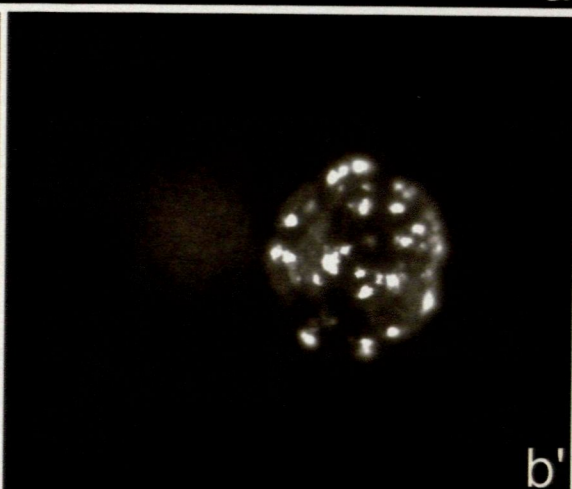
**a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c')imagen G.**



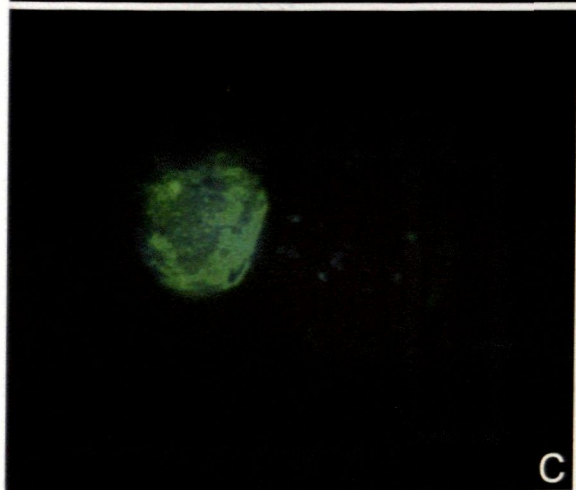
a



b



b'



c



c'

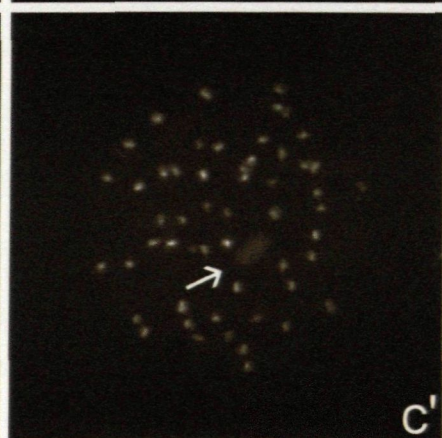
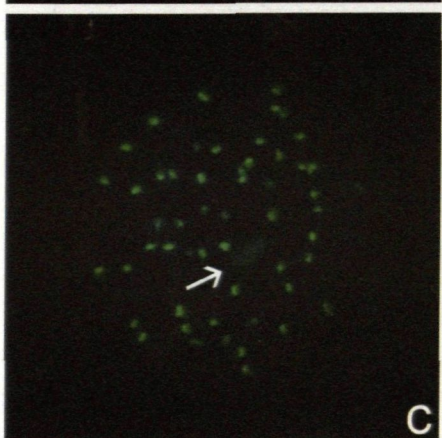
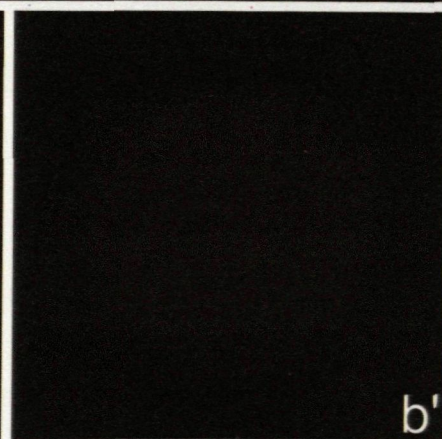
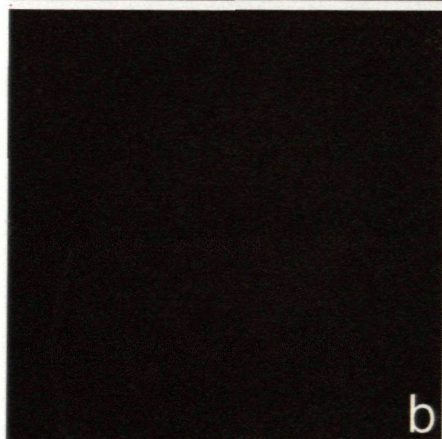
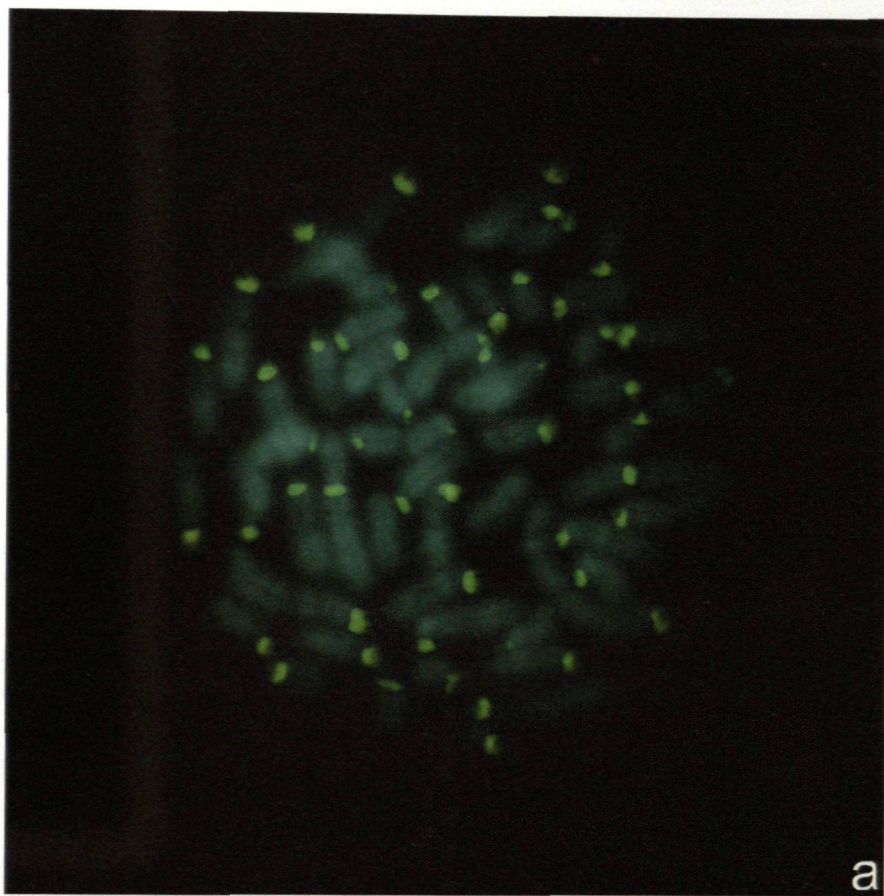
### **Figura 17**

**Metafase de *Microtus nivalis* (NIV) sobre las que se han comparado los genomas de *Microtus cabreræ* y NIV mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) en presencia de la secuencia MSAT-160 de CAB.**

El genoma de CAB se marcó para ser revelado en rojo (R) y se comparó con el de NIV en verde (G) mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G, en presencia de la secuencia MSAT-160 de CAB en G (MSAT-CAB-G). Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones de heterocromatina de los centrómeros y del cromosoma Y (*flechas*) muestran fluorescencia G (procedente exclusivamente de NIV-G, ya que hemos comprobado que MSAT-CAB no hibrida sobre NIV).

a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c')imagen G.





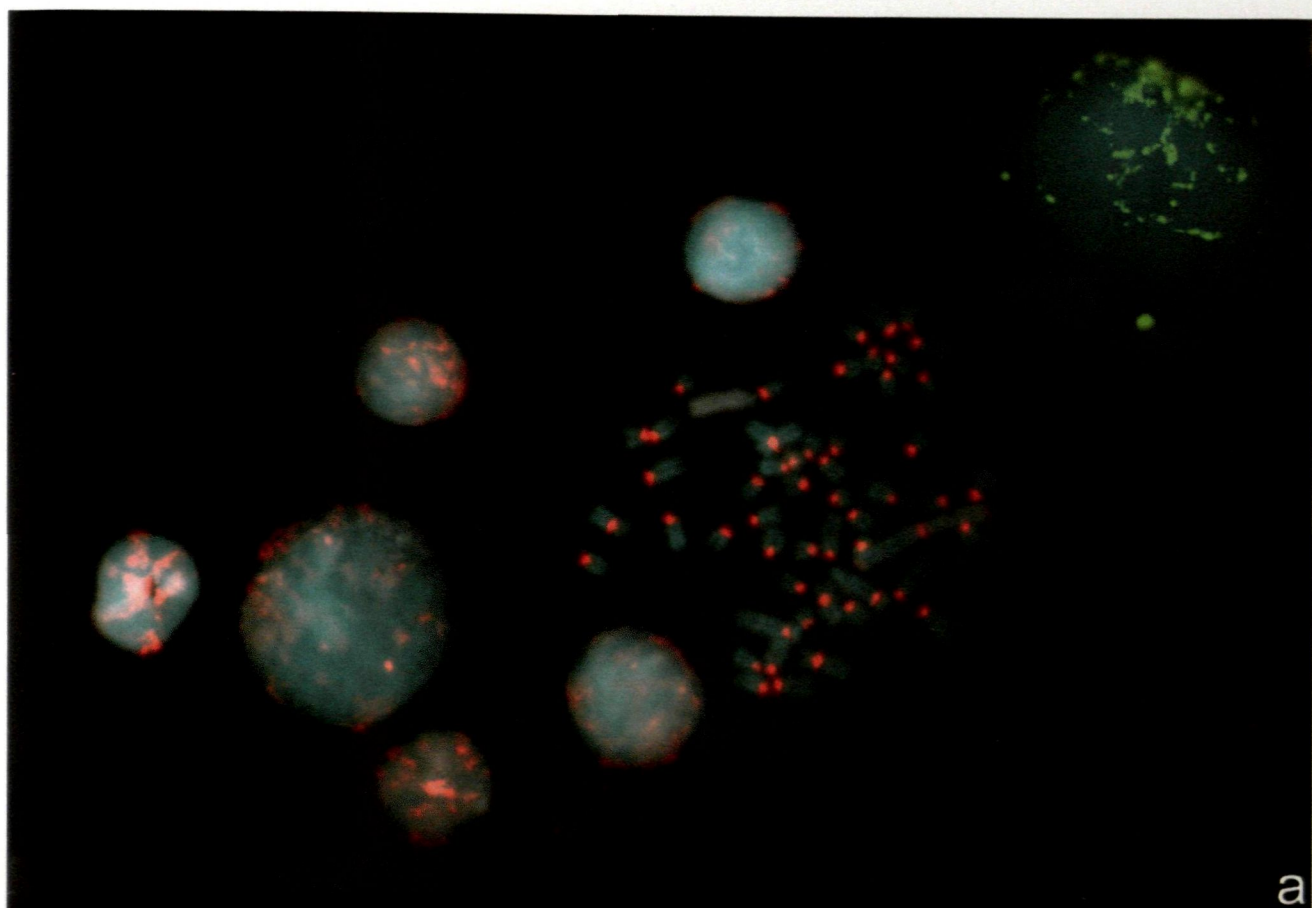
### **Figura 18**

**Linfocitos de *Microtus cabreræ* (CAB) y *Microtus nivalis* (NIV) mezclados, sobre los que se han comparado los genomas de CAB y NIV mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) en presencia de la secuencia MSAT-160 de CAB.**

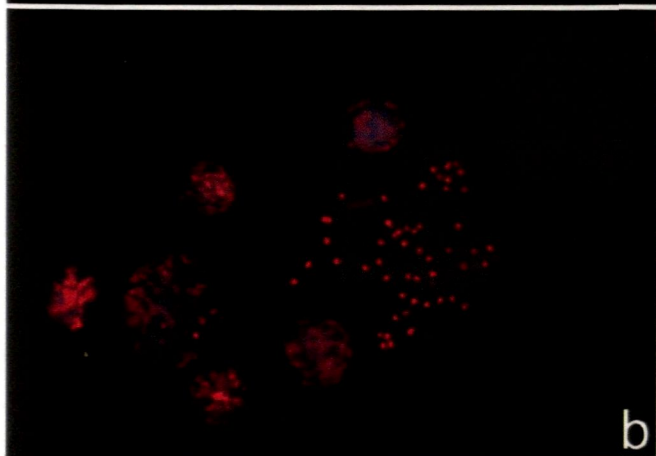
El genoma de CAB se marcó para ser revelado en rojo (R) y se comparó con el de NIV en verde (G) mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G en presencia de la secuencia MSAT-160 de CAB en R (MSAT-CAB-R). Las regiones de eucromatina muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones de heterocromatina de NIV (*linfocito, derecha*) muestran fluorescencia G (de NIV-G), mientras que las de CAB manifiestan una fluorescencia predominante R (procedente de la suma de CAB-R y MSAT-CAB-R). Al no observarse hibridación en R sobre NIV, se comprueba que MSAT-CAB-R no hibrida sobre las regiones centroméricas de los cromosomas de esta especie.

**a)** imagen RGB; **b)** imagen RB; **b')** imagen R; **c)** imagen GB; **c')** imagen G.

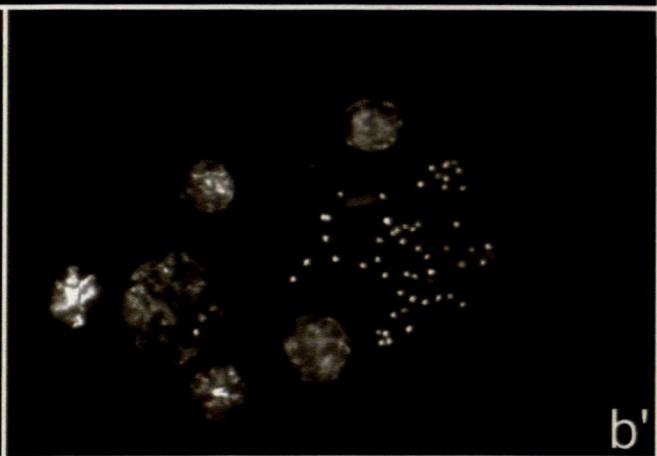




a



b



b'



c



c'

### **Figura 19**

#### **Comparación de los resultados de dos experimentos distintos de Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) sobre metafases de *Microtus nivalis* (NIV).**

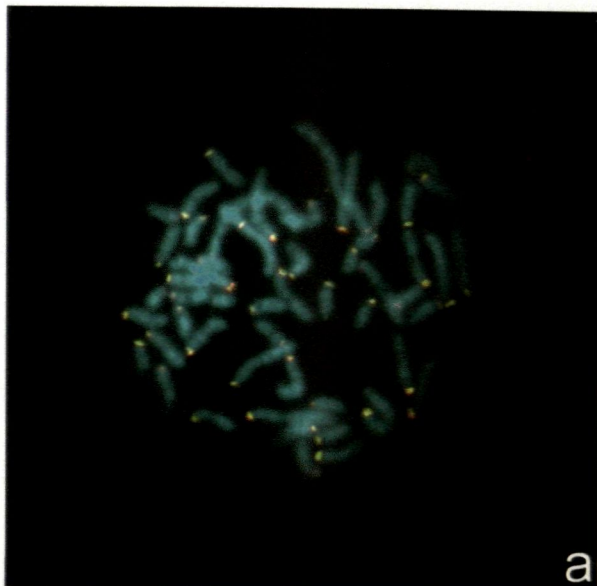
En la columna izquierda se observa una metafase de un linfocito de NIV sobre el que se han comparado los genomas de *Microtus cabreræ* (marcado para ser revelado en rojo –R–) y NIV (en verde –G–) mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G, en presencia de la secuencia MSAT-160 de NIV en R (MSAT-NIV-R). Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones de heterocromatina de los centromeros y del cromosoma Y (*flechas*) muestran fluorescencia predominante G (procedente de NIV-G). Además se observa señal de fluorescencia R (procedente de MSAT-NIV-R) en las regiones de heterocromatina centromérica, ausente en el bloque de heterocromatina del cromosoma Y (*flecha y b*).

En la columna derecha se observa el mismo experimento de W-CGH en ausencia de la secuencia MSAT-160 de NIV.

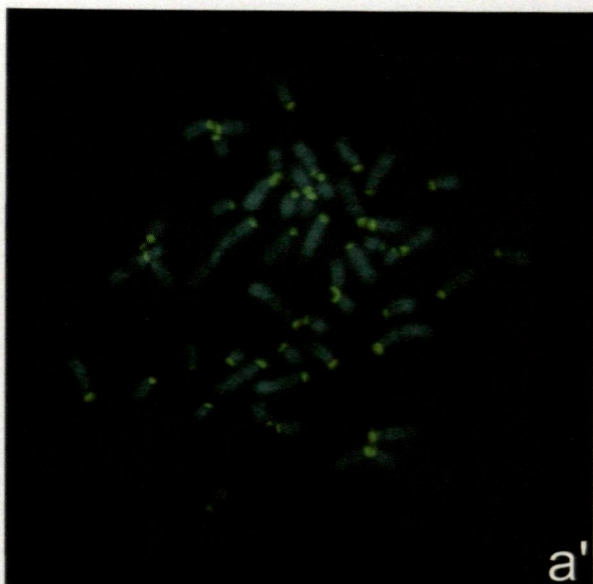
En (**b**) se observa señal de fluorescencia R (procedente de MSAT-NIV-R) en las regiones centroméricas de CAB que no aparece en (**b'**).

**a-a')** imágenes RGB; **b-b')** imágenes RB; **c-c')** imágenes GB.

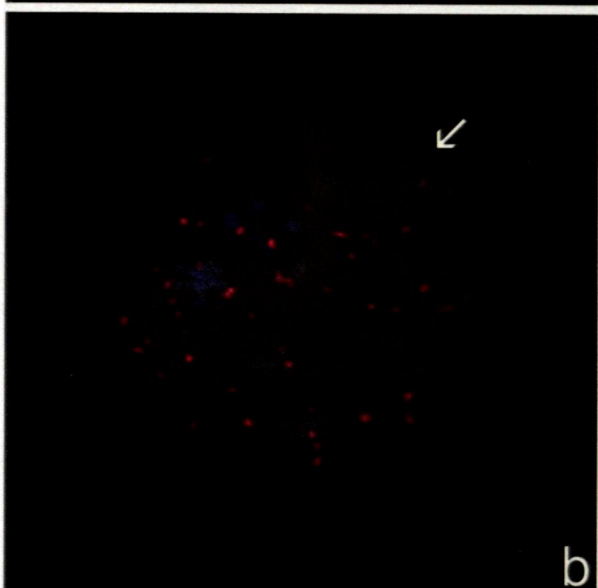




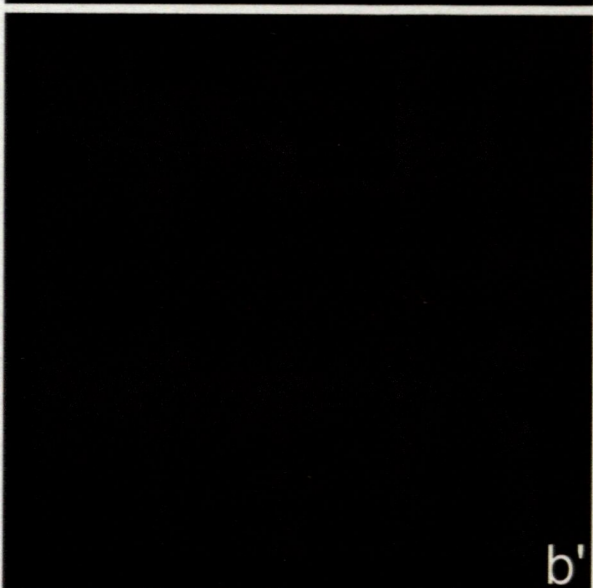
a



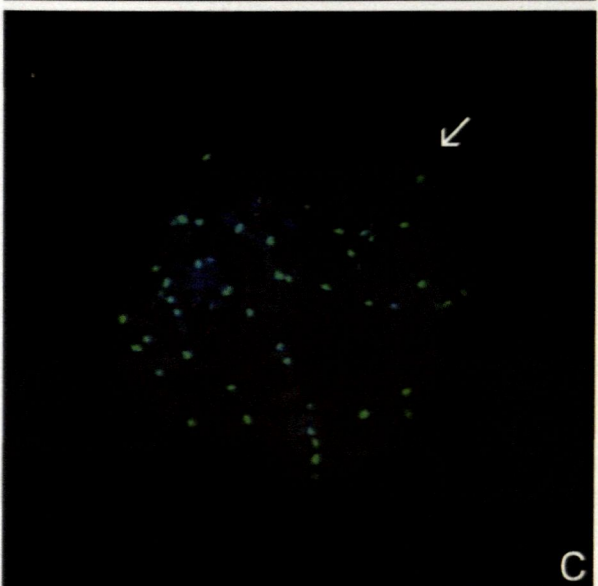
a'



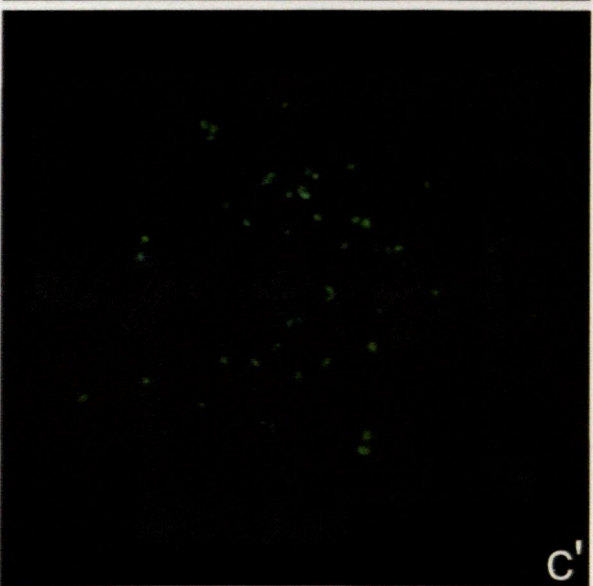
b



b'



c

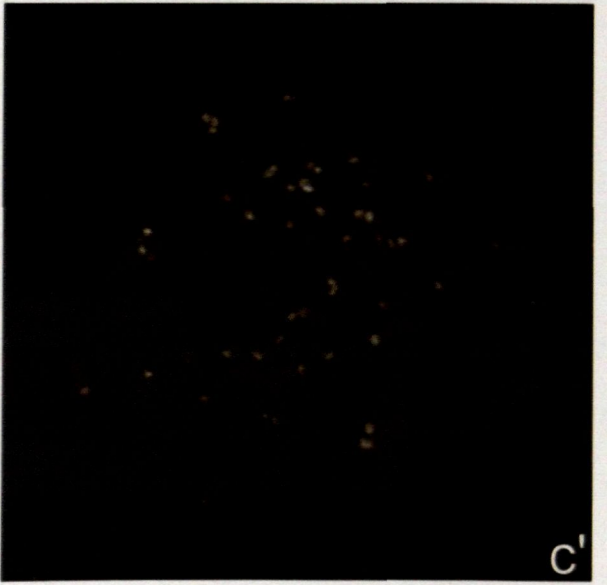
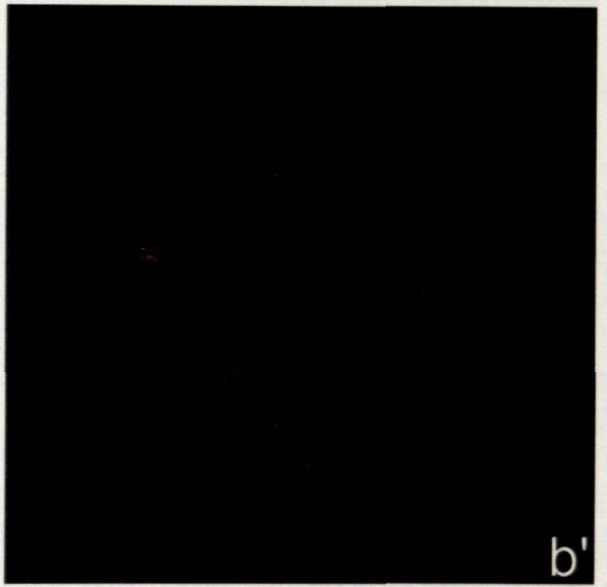
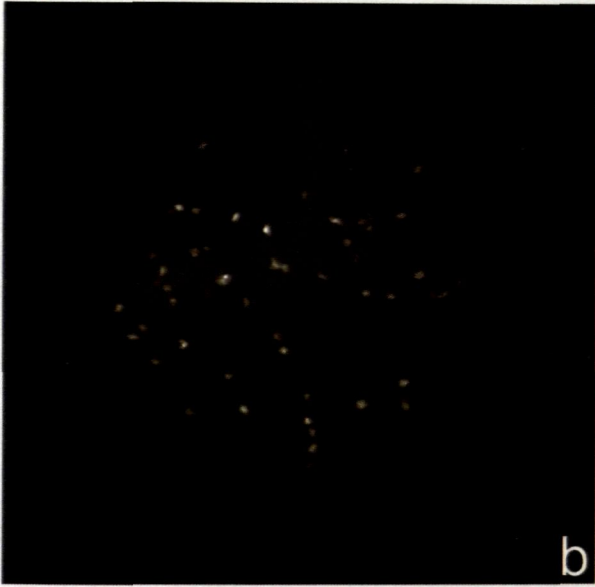
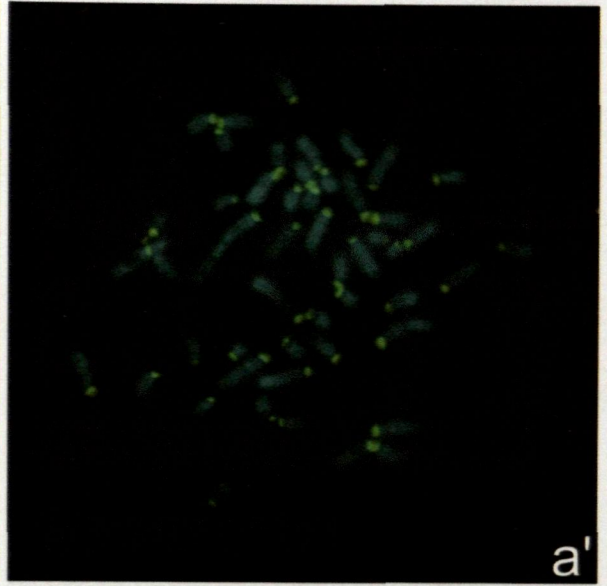
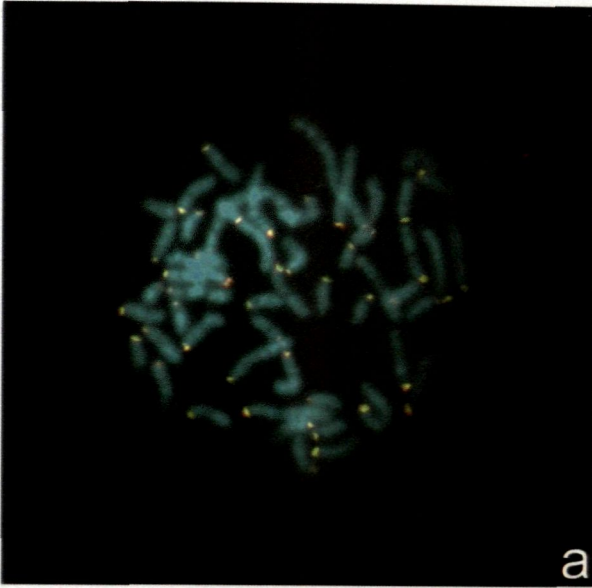


c'

**Figura 20**

**Desglose por canales de fluorescencia roja (R) y verde (G) de las imágenes de la Figura 19.**

**a-a')** imágenes RGB; **b-b')** imágenes R; **c-c')** imágenes G.



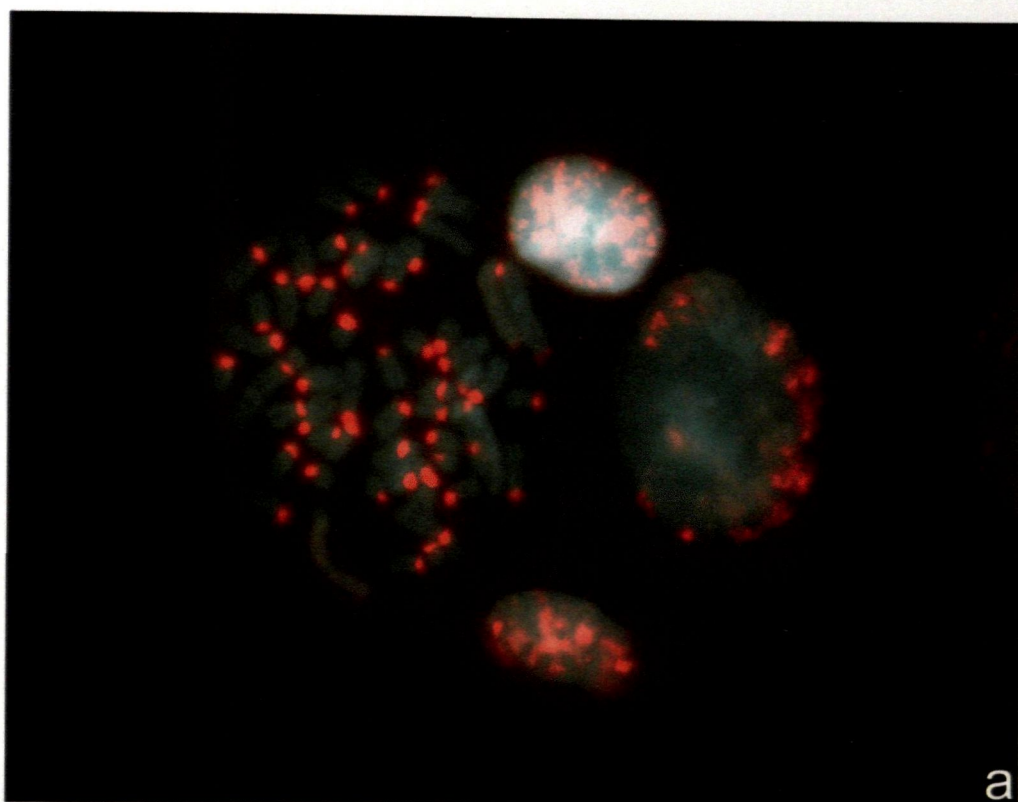
### **Figura 21**

**Metafase de *Microtus cabreræ* sobre las que se han comparado los genomas de CAB y *Microtus nivalis* (NIV) mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) en presencia de la secuencia MSAT-160 de NIV.**

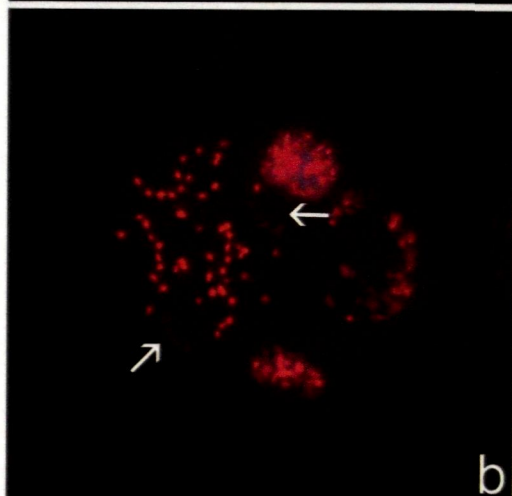
El genoma de CAB se marcó para ser revelado en rojo (R) y se comparó con el de NIV en verde (G) mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G, en presencia de la secuencia MSAT-160 de NIV en R (MSAT-NIV-R). Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones de heterocromatina de los centrómeros y de los cromosomas sexuales (*flechas*) muestran fluorescencia G.

a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c') imagen G.

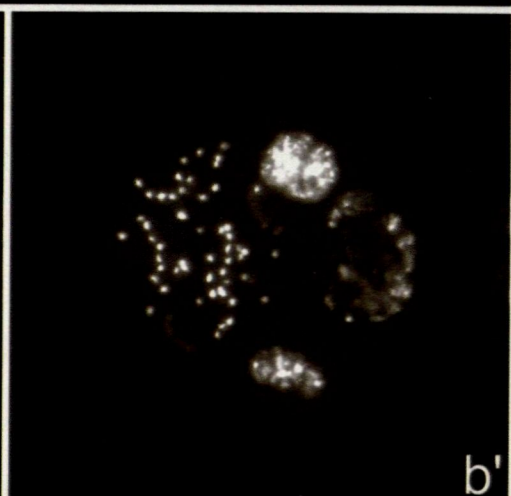




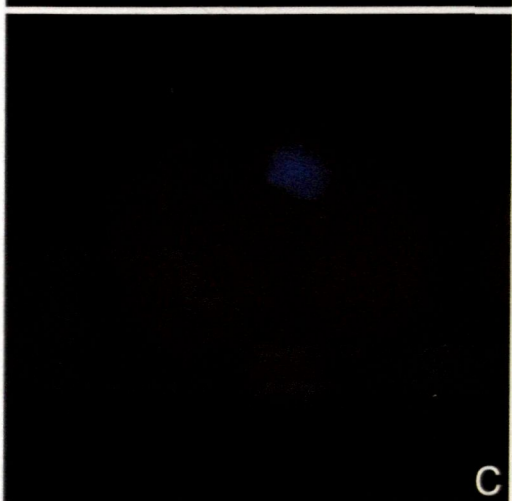
a



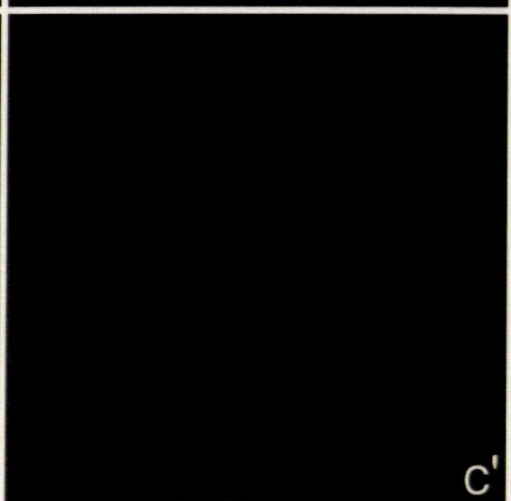
b



b'



c



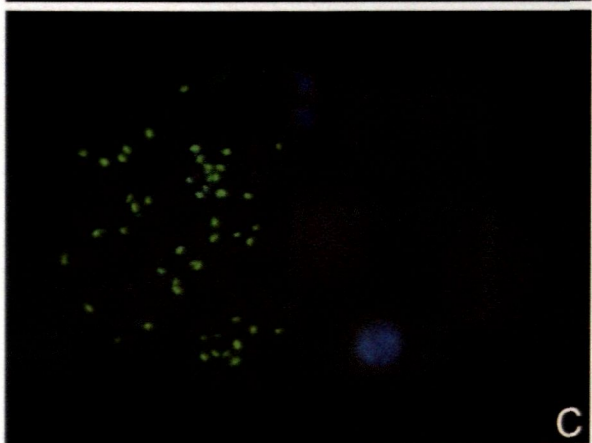
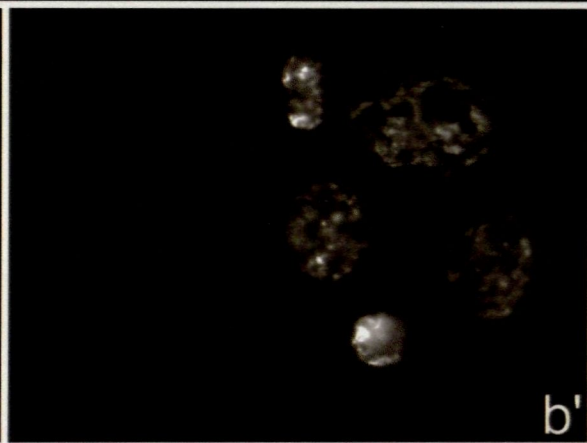
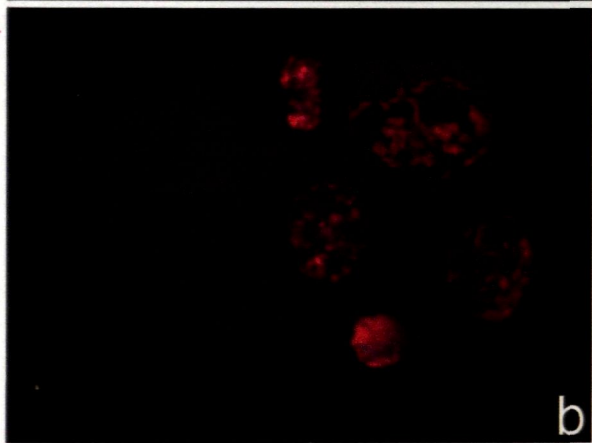
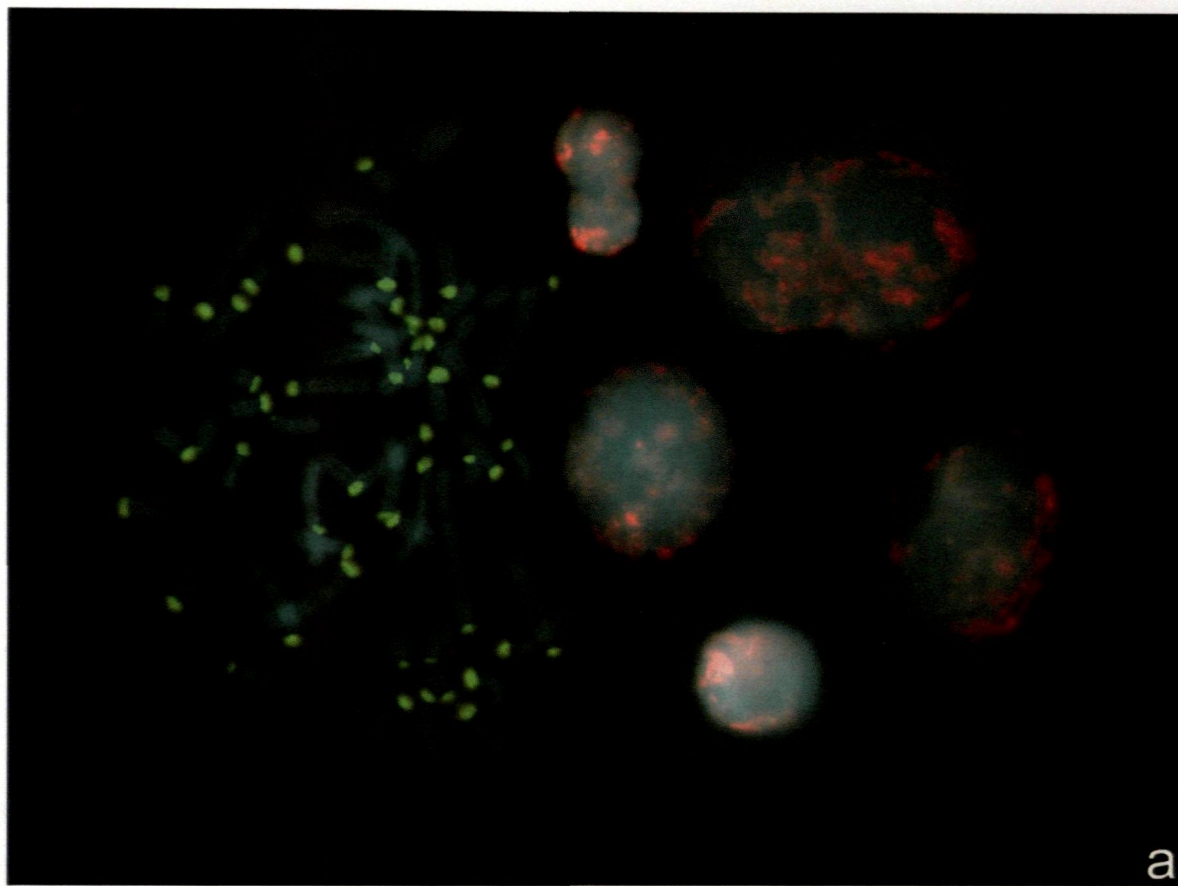
c'

### **Figura 22**

**Linfocitos de *Microtus cabreræ* (CAB) y *Microtus nivalis* (NIV) mezclados, sobre los que se han comparado los genomas de CAB y NIV mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) en presencia de la secuencia MSAT-160 de NIV.**

El genoma de CAB se marcó para ser revelado en rojo (R) y se comparó con el de NIV en verde (G) mediante la Sonda Híbrida: CAB-R/NIV-G, en presencia de la secuencia MSAT-160 de NIV en R (MSAT-NIV-G). Los brazos cromosómicos y las regiones de eucromatina muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Las regiones de heterocromatina de NIV (*metafase, izquierda*) muestran fluorescencia G (procedente de la suma de NIV-G y de MSAT-NIV-R). Mientras que las regiones de heterocromatina de CAB muestran fluorescencia R (de CAB-R). Al no haber hibridación en G sobre CAB, se comprueba que MSAT-NIV-G no hibrida sobre las regiones centroméricas de los cromosomas de esta especie.

**a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c')imagen G.**





### **Figura 23**

#### **Comparación de los genomas de *Arcyptera Tornosi* y *Arcyptera Fusca* mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

**a)** Comparación del genoma de *Arcyptera tornosi* (AT) marcado para ser revelado en verde (G) con el genoma de *Arcyptera fusca* (AF) marcado para ser revelado en rojo (R) mediante la Sonda Híbrida (SH): AT-G/AF-G, sobre el genoma de AT. Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjado (R + G). Los bloques de heterocromatina muestran fluorescencia R (de AF) en la región proximal y G (de AT) en la distal.

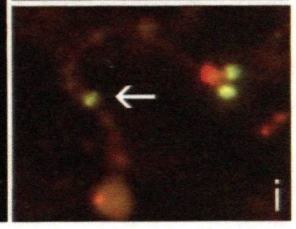
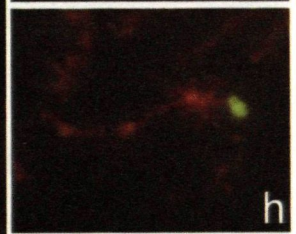
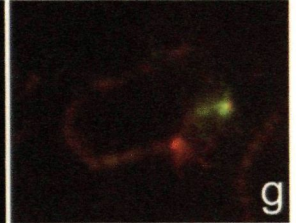
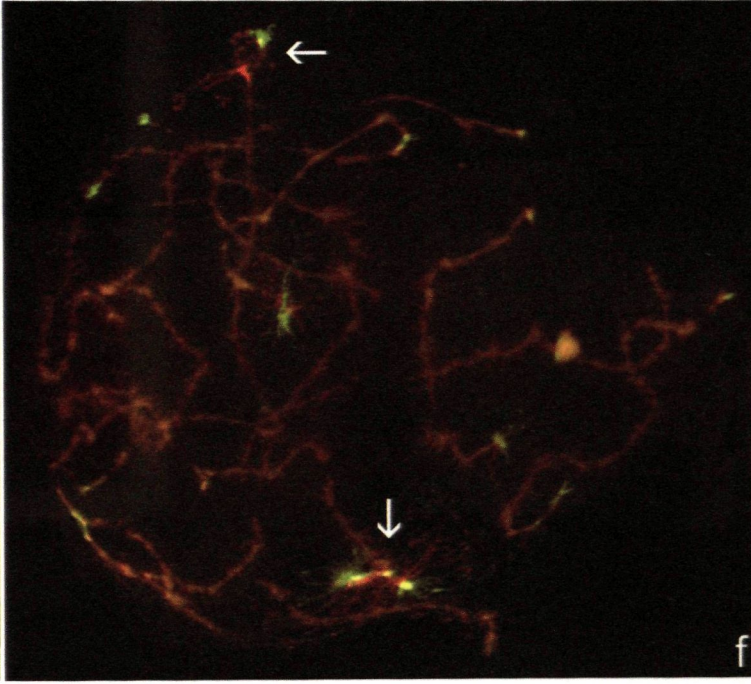
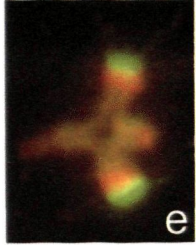
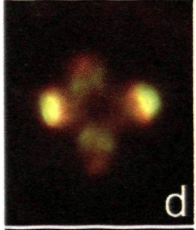
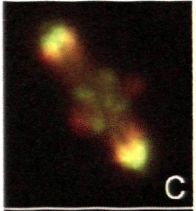
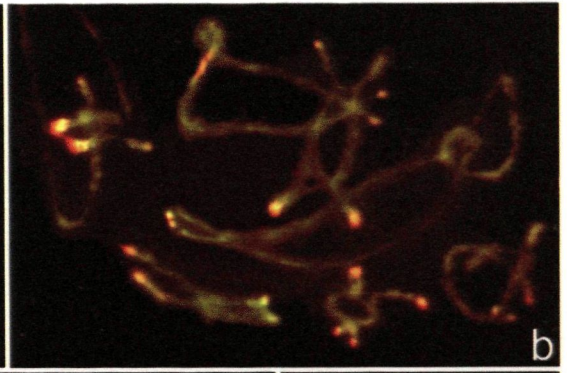
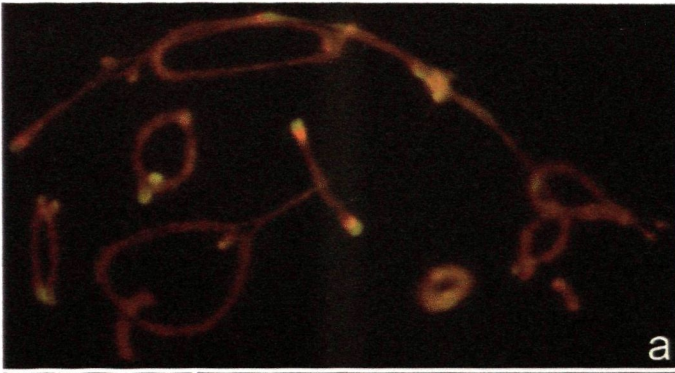
**b)** idéntico experimento con la SH inversa (AT-R/AF-G). Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjado (R + G). Sin embargo los bloques de heterocromatina muestran resultados invertidos con respecto a (a): fluorescencia G (de AF) en la región proximal y R (de AT) en la distal.

**c-e)** detalle de cromosomas de AT tras un experimento de WCGH empleando la SH: AT-G/AF-R.

**f)** Paquitene de AT tras un experimento de WCGH empleando la SH: AT-G/AF-R. Se observan las fluorescencias R y G en las regiones de heterocromatina (*flechas*).

**g-i)** Bivalente S9 de AT tras un experimento de WCGH empleando la SH: AT-G/AF-R. Los resultados muestran como las dos familias de ADNsat no se condensan al mismo tiempo. La familia localizada en posición distal (en G) se condensa más tempranamente que la familia localizada en la región proximal (en R) a lo largo de la Profase meiótica. También se localiza una región cromosómica de eucromatina en el cromosoma S9 que muestra fluorescencia G (de AT) (*flecha*).





## **Figura 24**

### **Resultados del estudio de genomas de distintos primates mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

En todos los casos los experimentos se realizaron sobre linfocitos del mismo individuo, un varón (V2).

**a)** Comparación del genoma de un hombre (varón) (V2) marcado para ser revelado en verde (G), con su mismo genoma marcado para ser revelado en rojo (R) mediante la Sonda Híbrida (SH): V2-G/V2-R (control).

**a')** Experimento idéntico (control).

**b)** Comparación del genoma de V2 marcado para ser revelado en G (V2-G), con el de una mujer en R (M2-R), mediante la SH: V2-G/M2-R.

**b')** Experimento con SH inversa (V2-R/M2-G).

**c)** Comparación de V2-G, con el genoma de un chimpancé marcado para ser revelado en R (CH-R), mediante la SH: V2-G/CH-R.

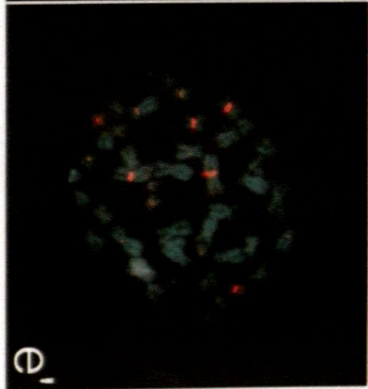
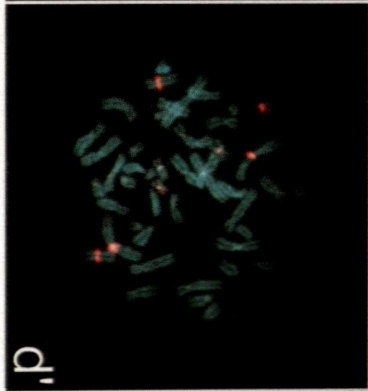
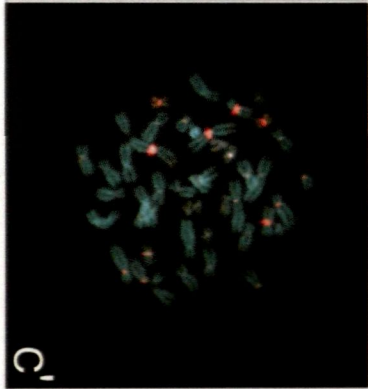
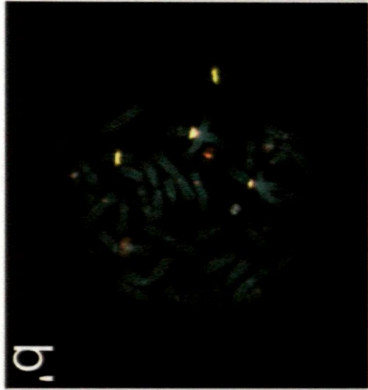
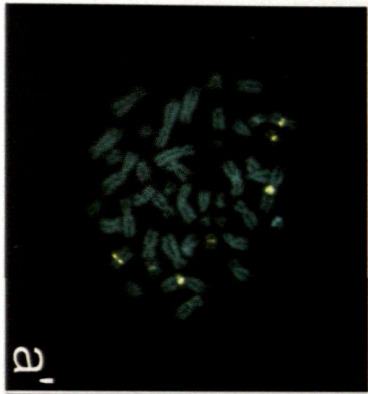
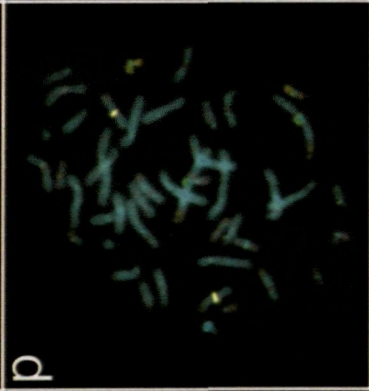
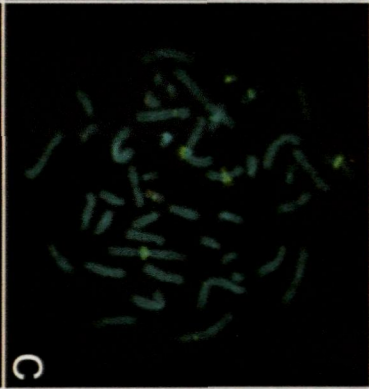
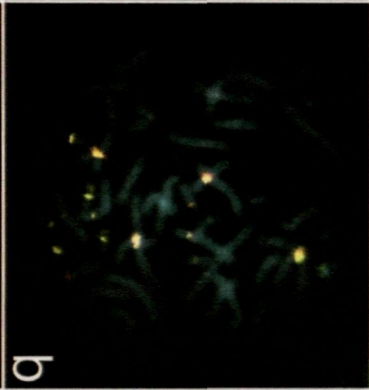
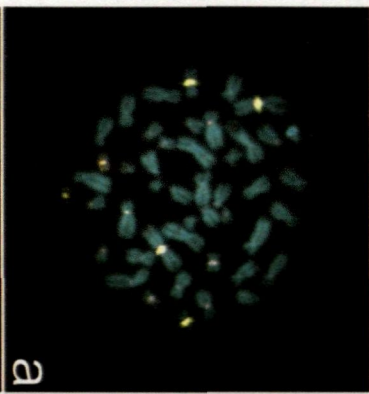
**c')** Experimento con SH inversa (V2-R/CH-G).

**d)** Comparación de V2-G, con el genoma de un gorila marcado para ser revelado en R (GO-R), mediante la SH: V2-G/GO-R.

**d')** Experimento con SH inversa (V2-R/GO-G).

**e)** Comparación de V2-G, con el genoma de un mono verde marcado para ser revelado en R (MV-R), mediante la SH: V2-G/MV-R.

**e')** Experimento con SH inversa (V2-R/MV-G).





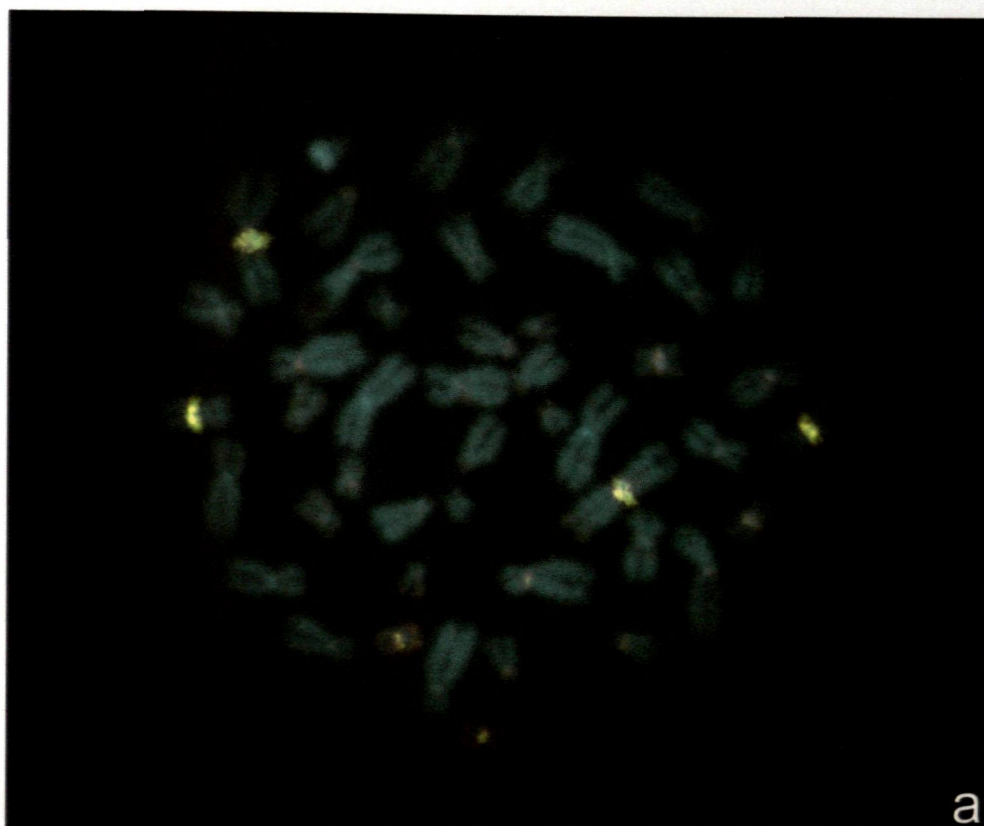
### **Figura 25**

#### **Control del estudio de genomas de primates mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

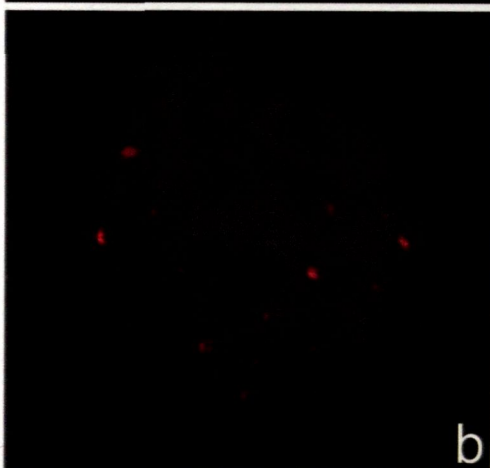
El genoma de un varón (V2) se marcó para ser revelado en verde (G) y en rojo (R), independientemente, y la Sonda Híbrida resultante (V2-G/V2-R) se hibridó sobre linfocitos de V2.

Los brazos cromosómicos y las regiones de heterocromatina centromérica muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G), apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B) en los brazos cromosómicos, no así en las regiones de heterocromatina centromérica donde la fluorescencia es más intensa.

**a)** imagen RGB; **b)** imagen RB; **b')** imagen R; **c)** imagen GB; **c')** imagen G.



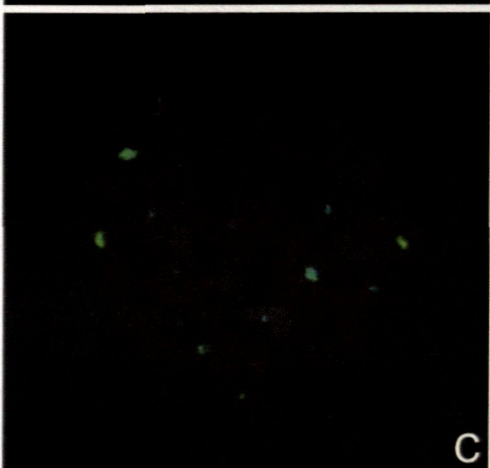
a



b



b'



c



c'

### **Figura 26**

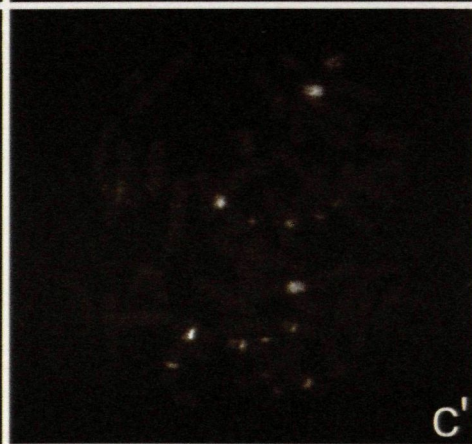
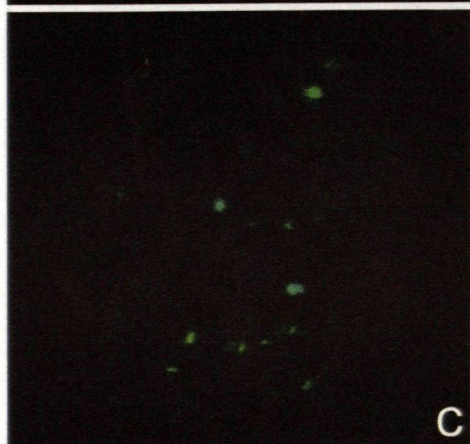
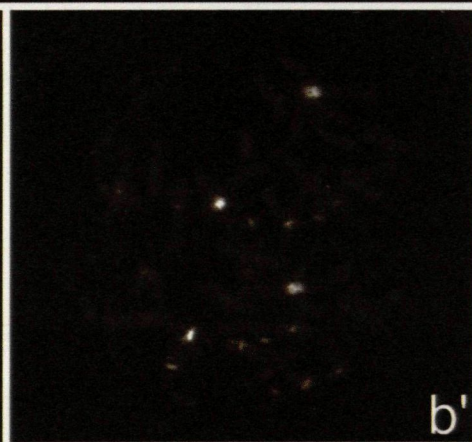
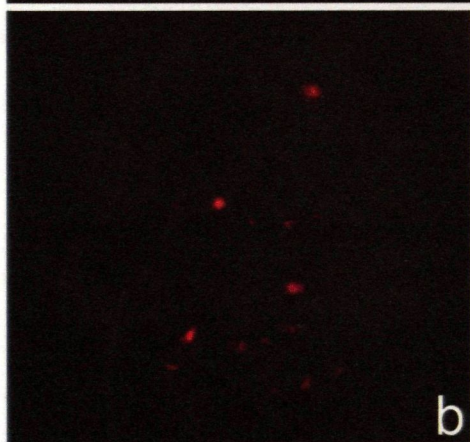
#### **Metafase de un hombre (varón) sobre el que se ha comparado su genoma con el de una mujer mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de un varón (V2) se marcó para ser revelado en verde (G) y el de una mujer (M2) en rojo (R), la Sonda Híbrida resultante (V2-G/M2-R) se hibridó sobre linfocitos de V2.

Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Por el contrario, en ciertas regiones de heterocromatina centromérica aparecen ciertos cromosomas con fluorescencia dominante R o G. Concretamente los bloques de heterocromatina del cromosoma 9-9' muestran fluorescencia R (de M2) (*flechas blancas*) levemente predominante, mientras que el cromosoma 16-16' (*flechas amarillas*) y el cromosoma Y (*flecha verde*) fluorescen predominantemente en G (de V2).

a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c') imagen G.





### **Figura 27**

**Metafase de un hombre (varón) sobre el que se ha comparado su genoma con el de un chimpancé mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de un varón (V2) se marcó para ser revelado en verde (G) y el de un chimpancé (CH) en rojo (R), la Sonda Híbrida resultante (V2-G/CH-R) se hibridó sobre linfocitos de V2.

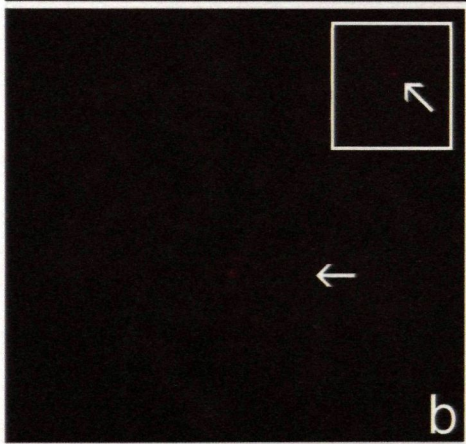
Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Mientras que las regiones de heterocromatina centromérica muestran una notable predominancia de fluorescencia G (de V2). Sin embargo se observa una pequeña señal de hibridación en R en la región pericentromérica del cromosoma 1-1' coincidiendo con la región del satélite-alfa (*flechas*).

**a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c')imagen G.**

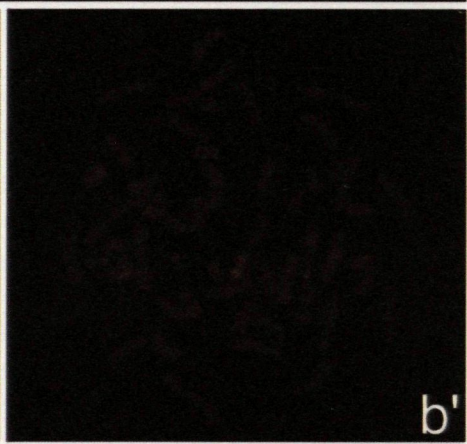




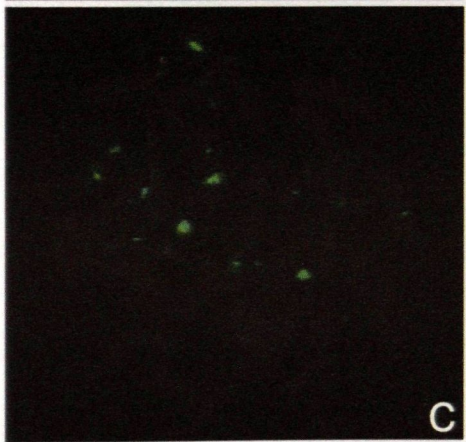
a



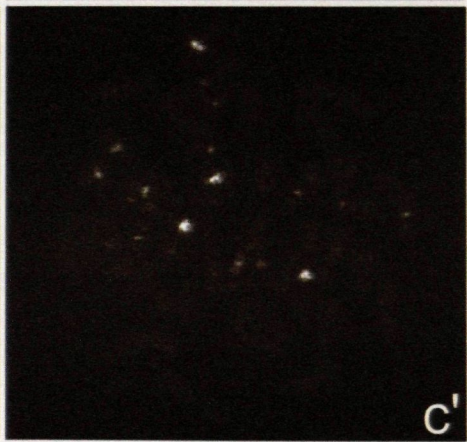
b



b'



c



c'

### **Figura 28**

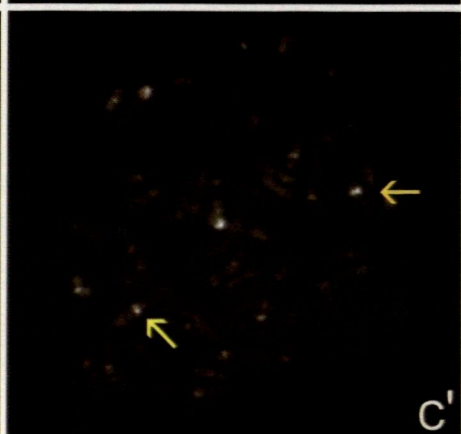
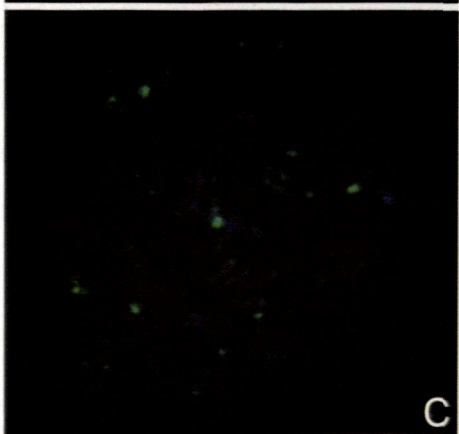
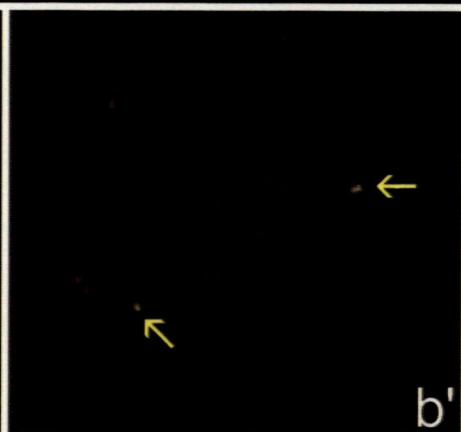
**Metafase de un hombre (varón) sobre el que se ha comparado su genoma con el de un gorila mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de un varón (V2) se marcó para ser revelado en verde (G) y el de un gorila (GO) en rojo (R), la Sonda Híbrida resultante (V2-G/GO-R) se hibridó sobre linfocitos de V2.

Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Mientras que en las regiones de heterocromatina centromérica muestran una notable predominancia de fluorescencia G (de V2). Se observa una llamativa excepción en el cromosoma 9 en el que, a pesar de ser más abundante la fluorescencia G (de V2), aparece una clara señal de fluorescencia R (procedente de GO-R) (*flechas*).

**a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c') imagen G.**



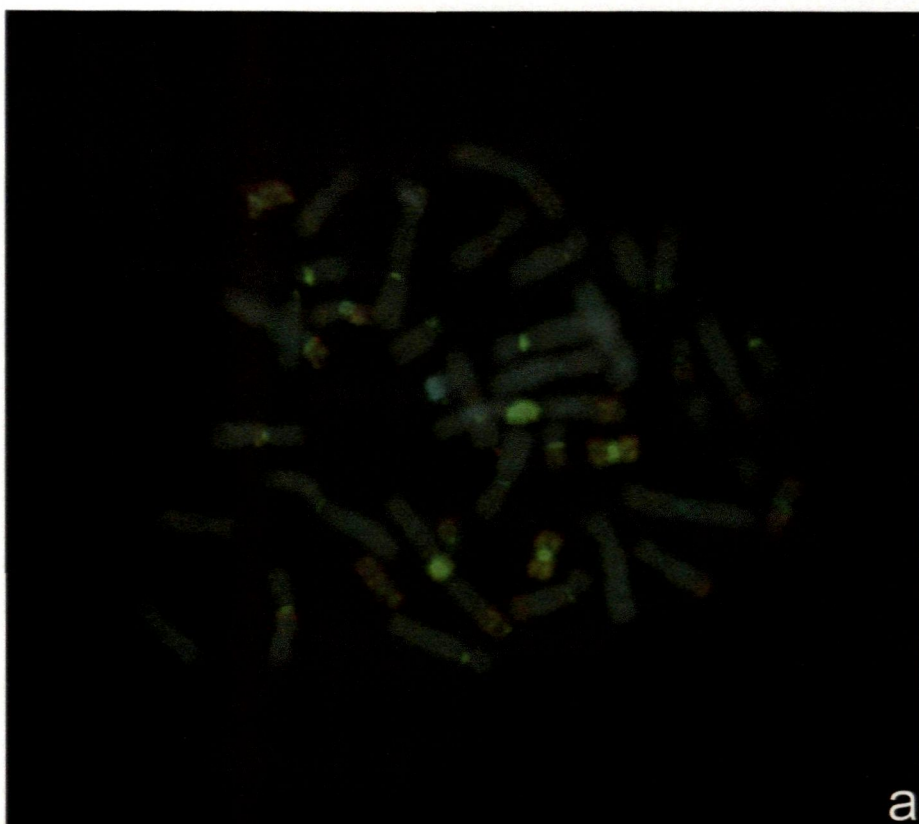


### **Figura 29**

**Metafase de un hombre (varón) sobre el que se ha comparado su genoma con el de un mono verde mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de un varón (V2) se marcó para ser revelado en verde (G) y el de un mono verde (MV) en rojo (R), la Sonda Híbrida resultante (V2-G/MV-R) se hibridó sobre linfocitos de V2. Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) levemente desplazada hacia el G (de V2-G), apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Mientras que en las regiones de heterocromatina centromérica muestran una notable predominancia de fluorescencia G (de V2).

**a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c') imagen G.**



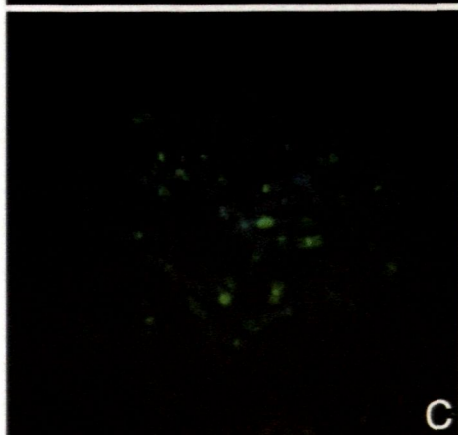
a



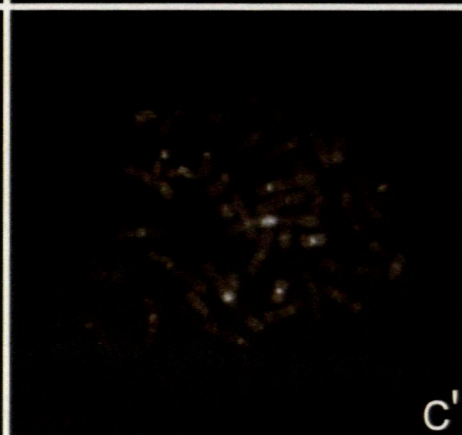
b



b'



c



c'



### **Figura 30**

**Metafasas de un varón y de una mujer sobre las que se han comparado sus genomas mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

Metafase de un hombre (varón) (V2) (a) y de una mujer (M2) (b).

El genoma de V2 se marcó para ser revelado verde (G) y el de M2 en rojo (R) y se compararon mediante la Sonda Híbrida: V2-G/M2-R.

En ambos casos, los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). Por el contrario, en ciertas regiones de heterocromatina centromérica aparecen ciertos cromosomas con fluorescencia dominante R o G. Concretamente los bloques de heterocromatina del cromosoma 9 muestran fluorescencia R (de M2) (*flechas blancas*) levemente predominante, mientras que el cromosoma 16 (*flechas amarillas*) y el cromosoma Y en V2 (*flecha verde*) fluorescen predominantemente en G (de V2). Los resultados por tanto resultan cualitativamente idénticos en las dos hibridaciones (con la excepción del cromosoma Y).

### **Figura 31**

**Detalles del cromosoma 1 y perfiles longitudinales de fluorescencias roja (R) y verde (G) extraídos de distintos experimentos de Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH) entre primates.**

En todos los casos se observa como la señal de fluorescencia es más intensa en las regiones de heterocromatina que en los brazos cromosómicos debido a que la cromatina se encuentra más condensada en dichas regiones. Asimismo en las regiones de heterocromatina centromérica es donde pueden presentarse mayores diferencias en la abundancia relativa de las secuencias entre genomas distintos.

a) Cromosoma 1 de un hombre (varón) (V2) sobre el que se ha comparado su genoma marcado en verde (G) con él mismo en rojo (R) (control), mediante la Sonda Híbrida (SH): V2-G/V2-R.

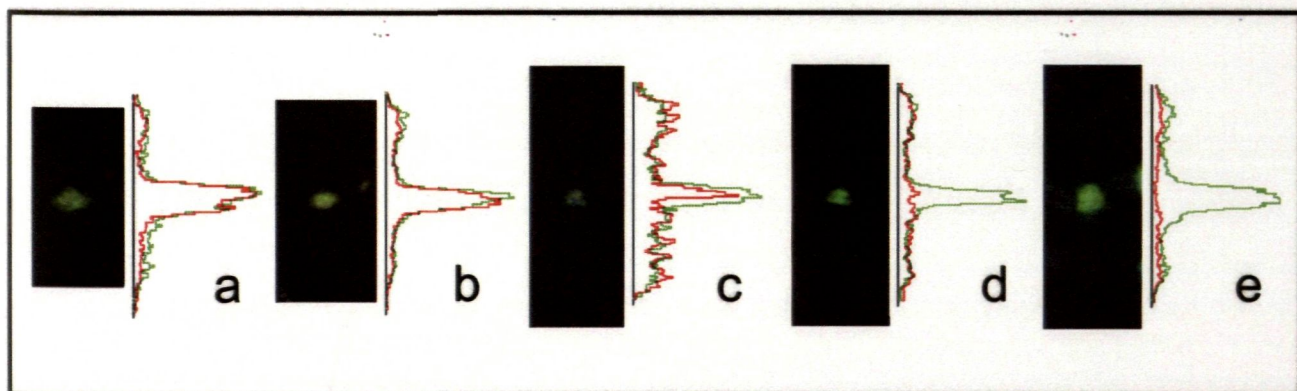
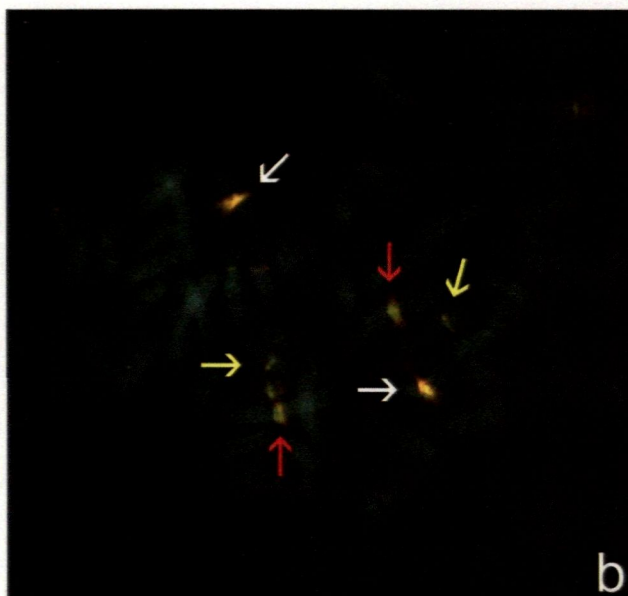
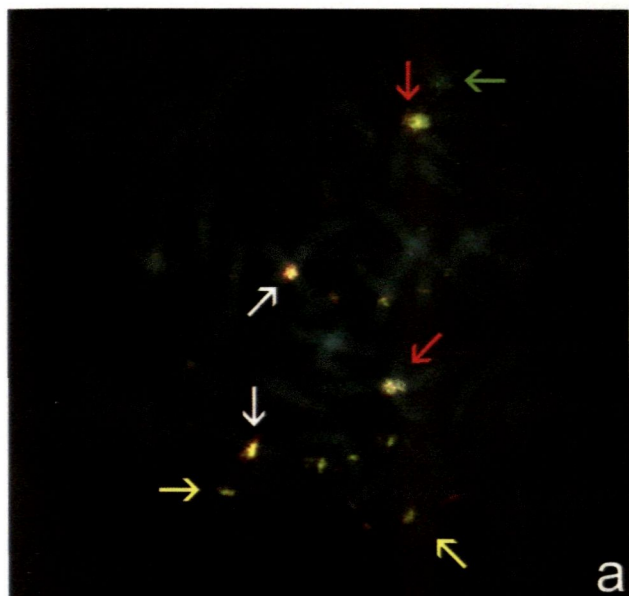
b) Cromosoma 1 de V2 sobre el que se ha comparado V2-G con el genoma de una mujer (M2) en R, mediante la SH: V2-G/M2-R. Se observa que dentro de la región centromérica, la familia de satélite-alfa está más representada en el genoma de V2 (en G) y la de satélite clásico II en M2 (en R).

c) Cromosoma 1 de V2 sobre el que se ha comparado V2-G con el genoma de un chimpancé (CH) en R, mediante la SH: V2-G/CH-R. Se observa una pequeña señal de hibridación en R (de CH-R) en la región pericentromérica del cromosoma 1 coincidiendo con la región del satélite-alfa.

d) Cromosoma 1 de V2 sobre el que se ha comparado V2-G con el genoma de un gorila (GO) en R, mediante la SH: V2-G/GO-R. Se observa una dominancia notable de la fluorescencia G (de V2-G).

e) Cromosoma 1 de V2 sobre el que se ha comparado V2-G con el genoma de un mono verde en R, mediante la SH: V2-G/MV-R. Se observa una dominancia notable de la fluorescencia G (de V2-G) sobre la R (de MV-R) a lo largo de todo el cromosoma.







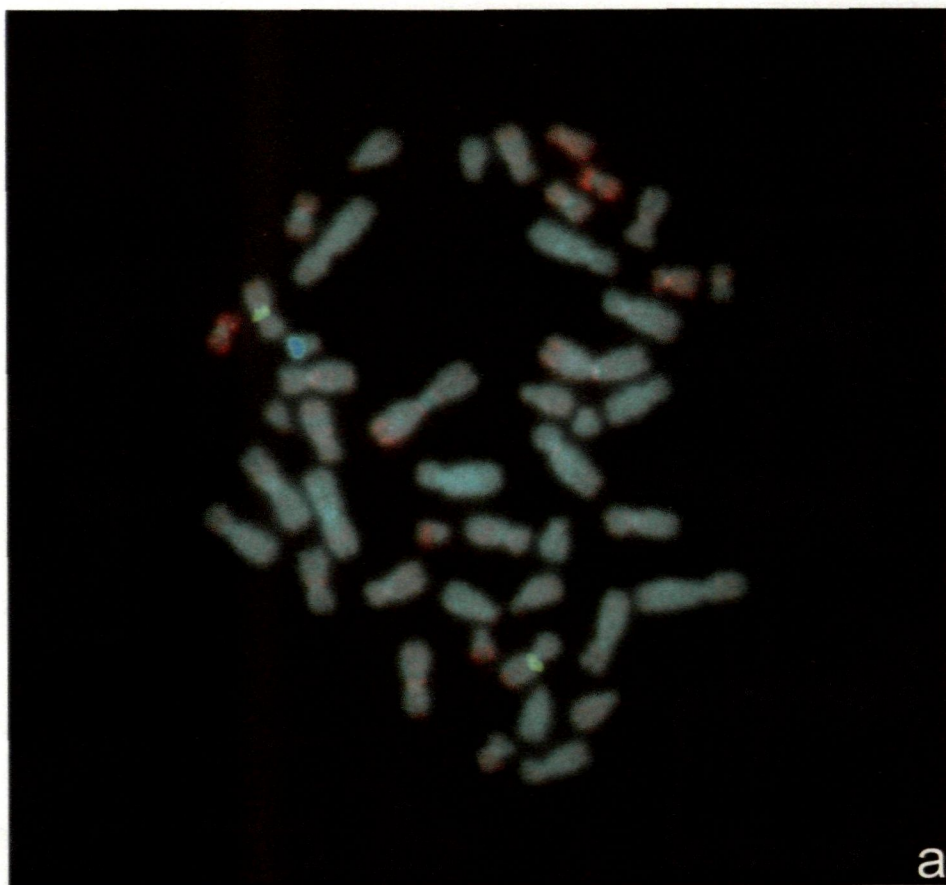
### **Figura 32**

**Metafase de un hombre (varón) sobre el que se han comparado los genomas de chimpancé y gorila mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

El genoma de un chimpancé (CH) se marcó para ser revelado en rojo (R) y el de un gorila (GO) en verde (G), la Sonda Híbrida resultante (CH-R/GO-G) se hibridó sobre linfocitos de un hombre (varón).

Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) pero con una notable prevalencia de la fluorescencia R (de CH-R) (**b'**) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). La mayoría de las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas humanos presentan ausencia total de hibridación de cualquiera de los dos genomas presentes en la SH y se observa claramente la señal B del DAPI. Sin embargo el cromosoma 9, muestra una abundante señal de hibridación en G (de GO-G) (*flechas blancas*). También el cromosoma 1 muestra una leve señal, en este caso de predominancia de fluorescencia R (de CH-R) (*flechas amarillas*).

**a)** imagen RGB; **b)** imagen RB; **b')** imagen R; **c)** imagen GB; **c')** imagen G.



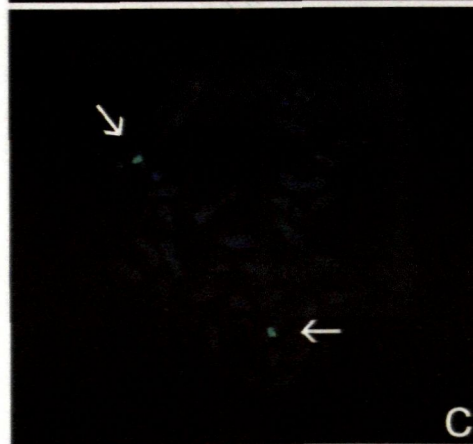
a



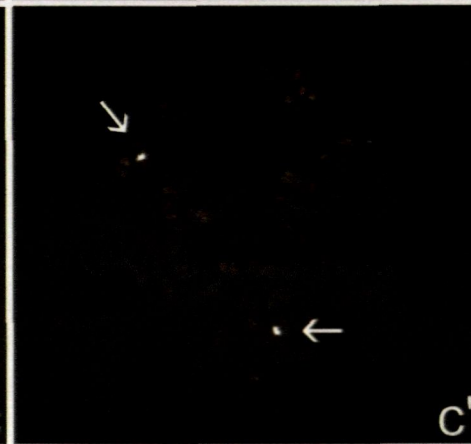
b



b'



c



c'



### **Figura 33**

**Metafase de un hombre (varón) sobre el que se han comparado los genomas de chimpancé y mono verde mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

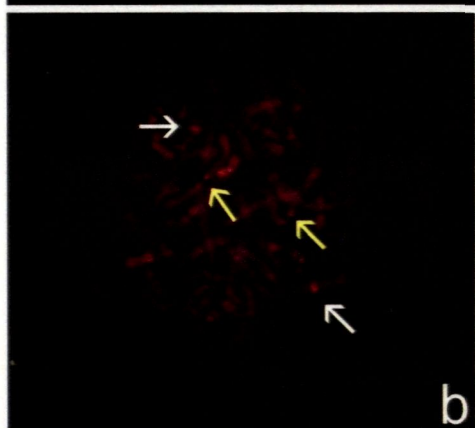
El genoma de un chimpancé (CH) se marcó para ser revelado en rojo (R) y el de un mono verde (MV) en verde (G), la Sonda Híbrida resultante (CH-R/MV-G) se hibridó sobre linfocitos de un hombre (varón).

Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) pero con una notable prevalencia de la fluorescencia R (de CH-R) (**b'**) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). La mayoría de las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas humanos presentan ausencia total de hibridación de cualquiera de los dos genomas presentes en la SH y muestran predominancia de la señal B del DAPI. Sin embargo los cromosomas 1 (*flechas amarillas*) y 9 (*flechas blancas*) muestra una leve señal, en este caso de predominancia de fluorescencia R (de CH-R).

a) imagen RGB; b) imagen RB; b') imagen R; c) imagen GB; c')imagen G.



a



b



b'



c



c'



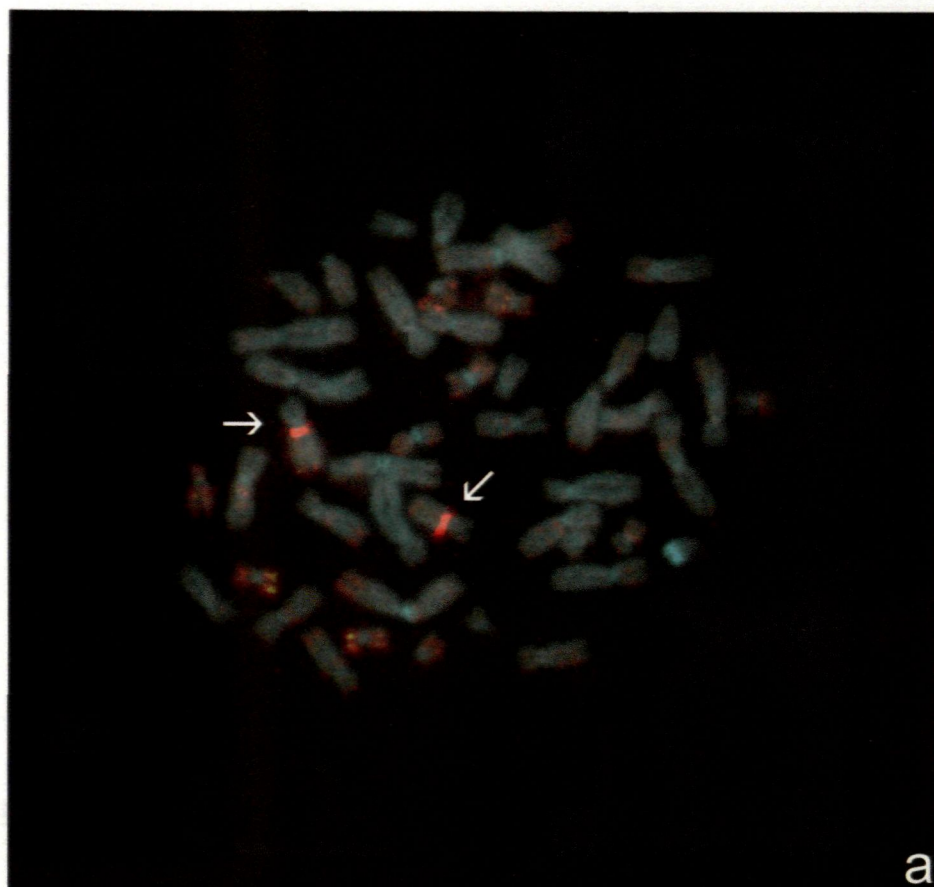
### **Figura 34**

**Metafase de un hombre (varón) sobre el que se han comparado los genomas de gorila y mono verde mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

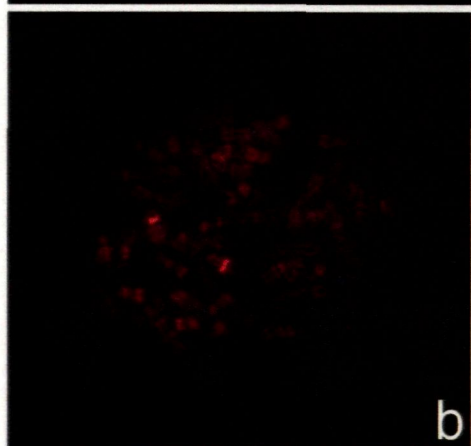
El genoma de un gorila (GO) se marcó para ser revelado en rojo (R) y el de un mono verde (MV) en verde (G), la Sonda Híbrida resultante (GO-R/MV-G) se hibridó sobre linfocitos de un hombre (varón).

Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) pero con una notable prevalencia de la fluorescencia R (de GO-R) (**b'**) apantallada bajo la contratinción con DAPI en azul (B). La mayoría de las regiones de heterocromatina centromérica de los cromosomas humanos presentan ausencia total de hibridación de cualquiera de los dos genomas presentes en la SH y muestran predominancia de la señal B del DAPI. Sin embargo la región centromérica del cromosoma 9-9' muestra una notable señal de fluorescencia R (de GO-R) (*flechas*).

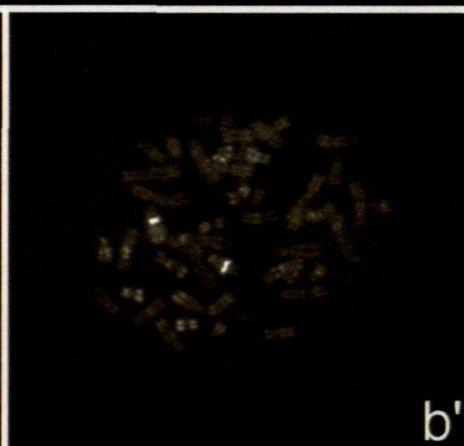
**a)** imagen RGB; **b)** imagen RB; **b')** imagen R; **c)** imagen GB; **c')** imagen G.



a



b



b'



c



c'



### **Figura 35**

#### **Interfases resultantes del estudio de genomas de distintos primates mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

En todos los casos las interfases corresponden a un hombre (varón; V2).

a) Comparación del genoma de un hombre (varón) (V2) marcado para ser revelado en verde (G), con su mismo genoma marcado para ser revelado en rojo (R) mediante la Sonda Híbrida (SH): V2-G/V2-R (control). Se observan las señales coincidentes de fluorescencia R y G.

a') Imagen RB.

a'') Imagen GB.

b) Comparación del genoma de V2 marcado para ser revelado en G (V2-G), con el de una mujer en R (M2-R) mediante la SH: V2-G/M2-R. Se observan señales coincidentes de fluorescencia R y G así como ciertas señales no coincidentes (*flecha*).

b') Imagen RB.

b'') Imagen GB.

c) Comparación de V2-G, con el genoma de un chimpancé marcado para ser revelado en R (CH-R) mediante la SH: V2-G/CH-R. Se observa una predominancia de las señales discretas G y alguna leve señal R (*flechas*).

c') Imagen RB.

c'') Imagen GB.

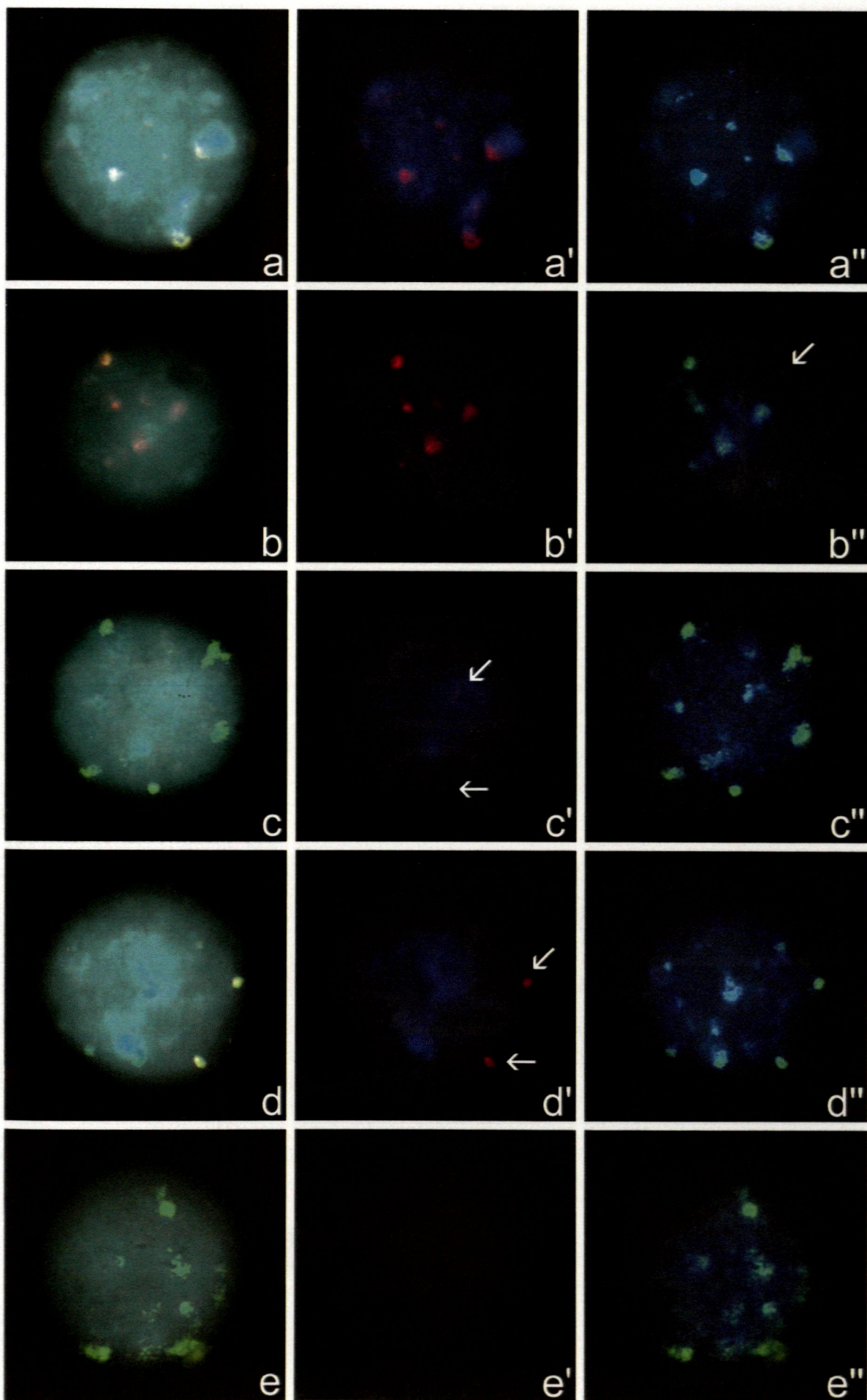
d) Comparación de V2-G, con el genoma de un gorila marcado para ser revelado en R (GO-R) mediante la SH: V2-G/GO-R. Se observa una predominancia de las señales discretas G y dos notables señales R (*flechas*).

d') Imagen RB.

d'') Imagen GB.

e) Comparación de V2-G, con el genoma de un mono verde marcado para ser revelado en R (MV-R) mediante la SH: V2-G/MV-R. Se observa una predominancia absoluta de las señales discretas G.







### **Figura 36**

#### **Interfases resultantes del estudio de genomas de distintos primates mediante Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

Se trata de las mismas imágenes de la Figura 35, mostrando adicionalmente los canales rojo (R) y verde (G). Por tanto, como en la imagen anterior, las interfases corresponden a un hombre (varón; V2).

a) Interfase resultante de la comparación del genoma de un hombre (varón) (V2) marcado para ser revelado en verde (G), con su mismo genoma marcado para ser revelado en rojo (R) mediante la Sonda Híbrida (SH): V2-G/V2-R (control). Se observa la hibridación homogénea de R y G en las regiones de eucromatina (**a'-a''**), así como las señales coincidentes de fluorescencia R y G (**a''**).

a') Imagen R.

a'') Imagen G.

b) Comparación del genoma de V2 marcado para ser revelado en G (V2-G), con el de una mujer en R (M2-R) mediante la SH: V2-G/M2-R. Se observa la hibridación homogénea de R y G en las regiones de eucromatina (**b'-b''**), así como las señales coincidentes de fluorescencia R y G y señales no coincidentes (*flechas*).

b') Imagen RB.

b'') Imagen GB.

c) Comparación de V2-G, con el genoma de un chimpancé marcado para ser revelado en R (CH-R) mediante la SH: V2-G/CH-R. Se observa la hibridación homogénea de R y G en las regiones de eucromatina con una leve predominancia G (**c'-c''**). Así como mayor abundancia de las señales discretas G (**c''**) y tan sólo alguna leve señal R (**c'**) (*flechas*).

c') Imagen RB.

c'') Imagen GB.

d) Comparación de V2-G, con el genoma de un gorila marcado para ser revelado en R (GO-R) mediante la SH: V2-G/GO-R. Se observa la hibridación homogénea de R y G en las regiones de eucromatina con una leve predominancia G (**d'-d''**). Así como mayor abundancia de las señales discretas G (**d''**) y dos notables señales R (**d'**) (*flechas*).

d') Imagen RB.

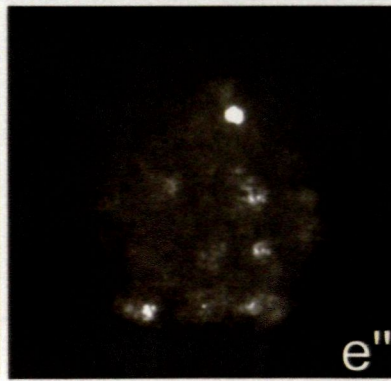
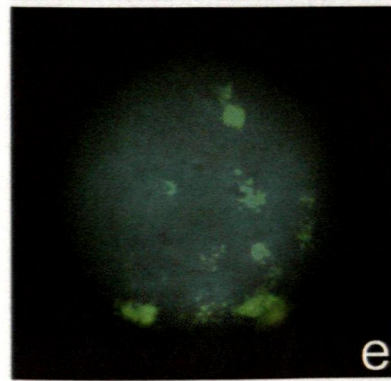
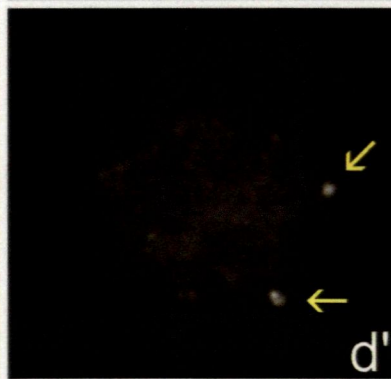
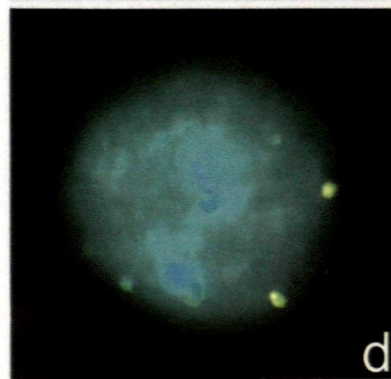
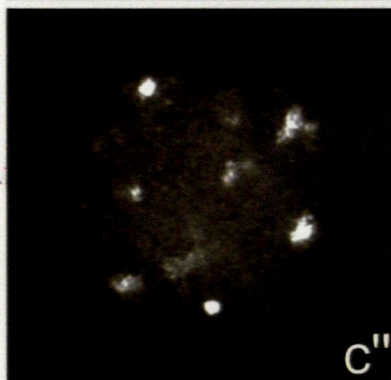
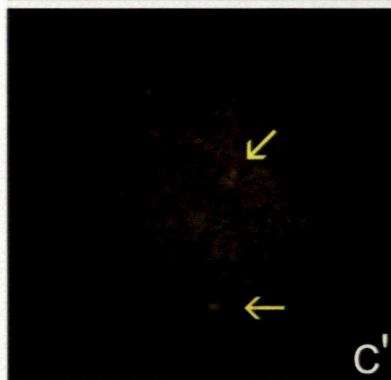
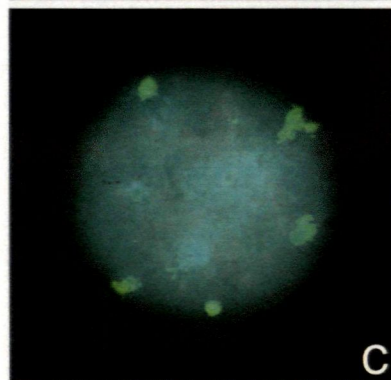
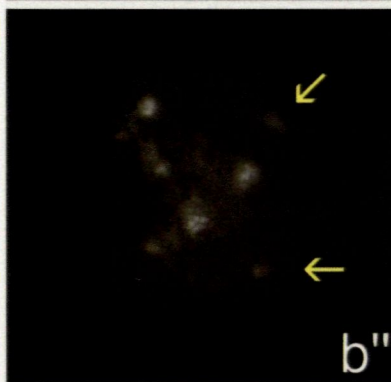
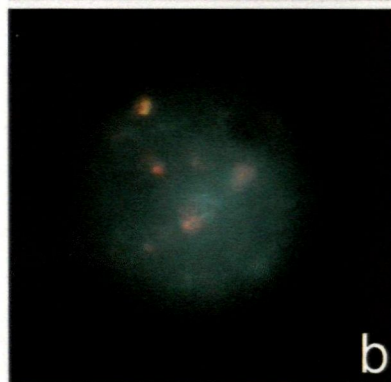
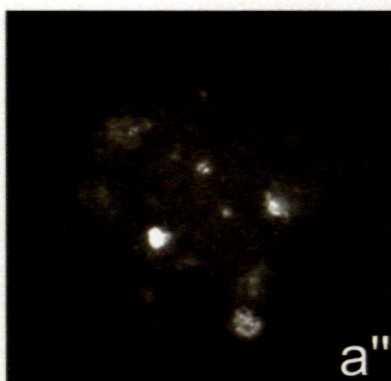
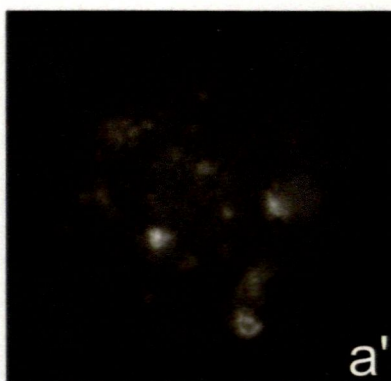
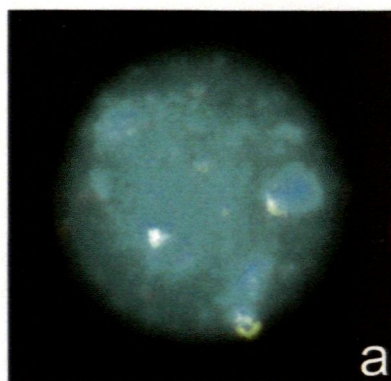
d'') Imagen GB.

e) Comparación de V2-G, con el genoma de un mono verde marcado para ser revelado en R (MV-R) mediante la SH: V2-G/MV-R. Se observa la hibridación homogénea de R y G en las regiones de eucromatina con una notable predominancia G (**e'-e''**), así como de las señales discretas G (**e''**).

e) Imagen RB.

e') Imagen GB.







### **Figura 37**

#### **Explicación esquemática del cálculo de Identidad Citogenética (IC) tras Hibridación Genómica Comparativa-Completa (W-CGH).**

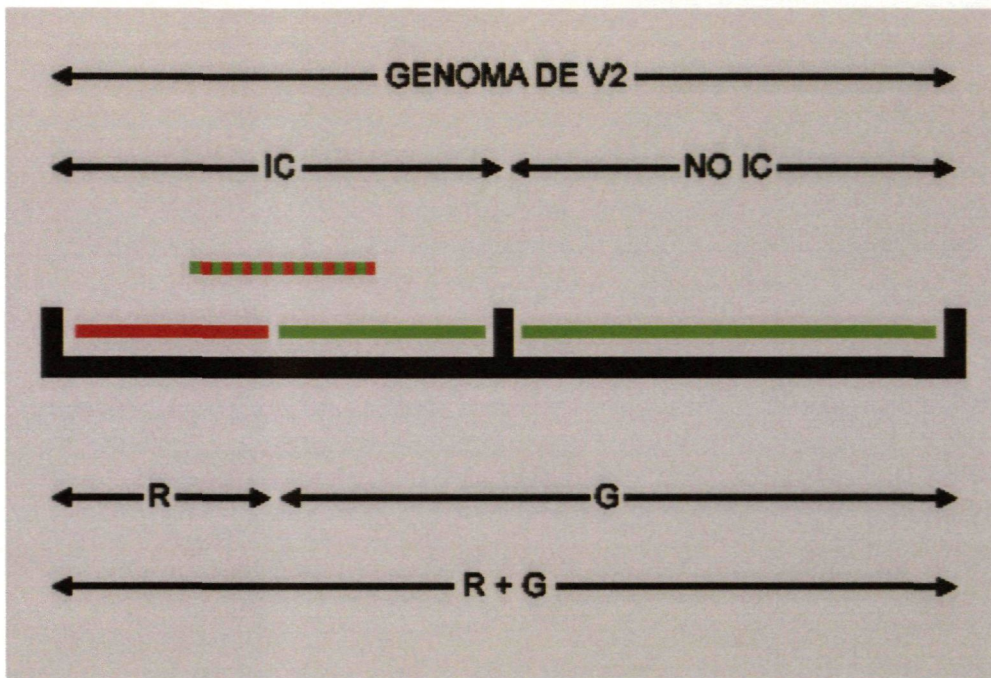
Se muestran dos situaciones hipotéticas: i) una IC del 50% (esquema superior) y ii) una IC del 90%. El genoma sobre el que se practica la W-CGH aparece representado como una gruesa línea (*genoma de V2*), dividido en dos regiones proporcionales en el caso de una IC del 50%. Sobre la región *NO IC* tan sólo hibridará el genoma *referencia* (revelado en verde –G–, en este caso), ya que el genoma *invitado* no presenta homología (por definición) en esta región. Sobre la región *IC* hibridarán tanto el genoma *referencia* (en G) como el *invitado* (revelado en rojo –R– en este caso), puesto que ambos presentan homología con esta región.

De forma análoga ocurre en el esquema inferior (Identidad Citogenética del 90%) con la diferencia de que la región de homología (*IC*) es mayor.

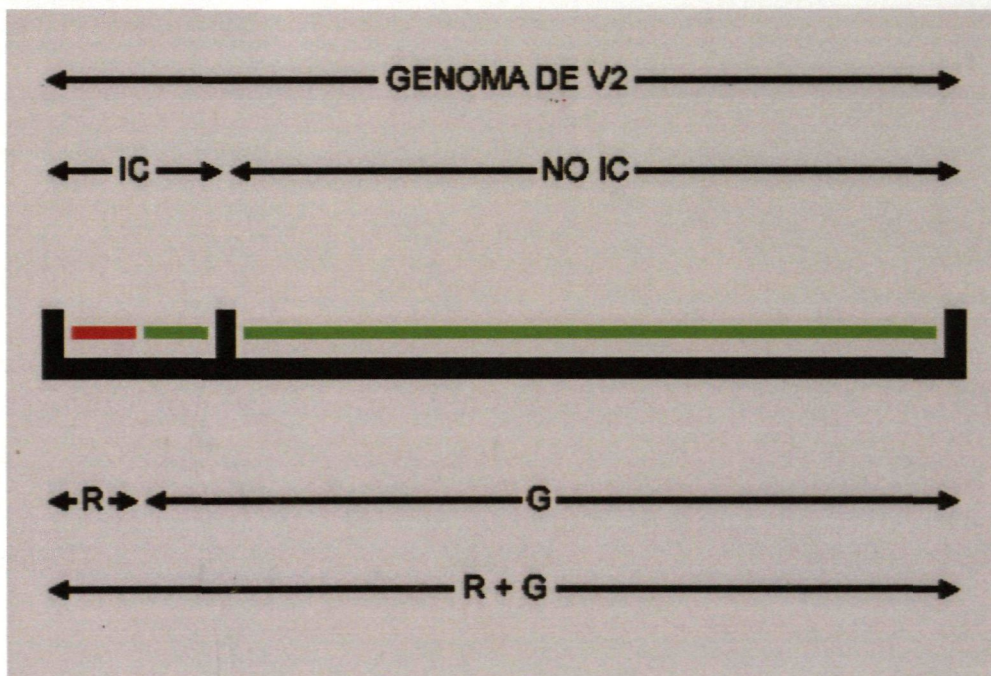
A partir del razonamiento anterior se puede deducir la fórmula para el cálculo de la IC. Si el genoma *referencia* se revela en G como en los esquemas mostrados, ésta será:  $IC = 2R / (R+G)$ . Por el contrario, si se revela en R, entonces será:  $IC = 2G / (R+G)$ .



### IDENTIDAD CITOGENÉTICA DEL 50%:



### IDENTIDAD CITOGENÉTICA DEL 90%:



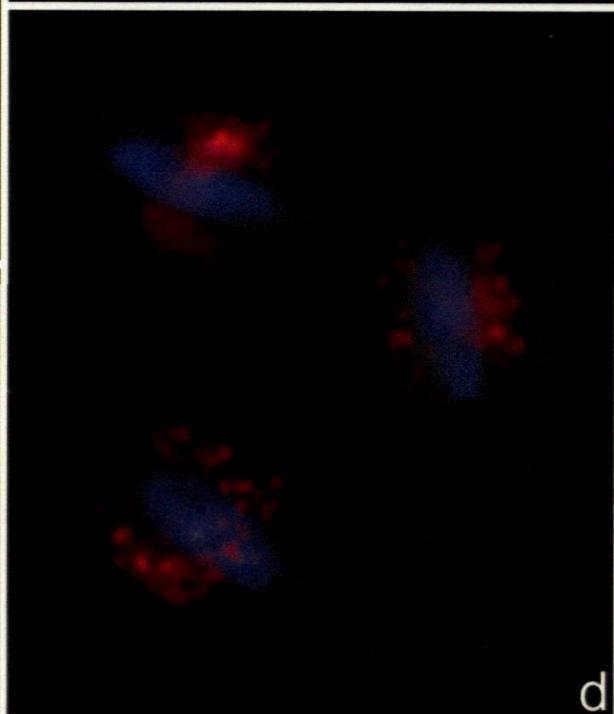
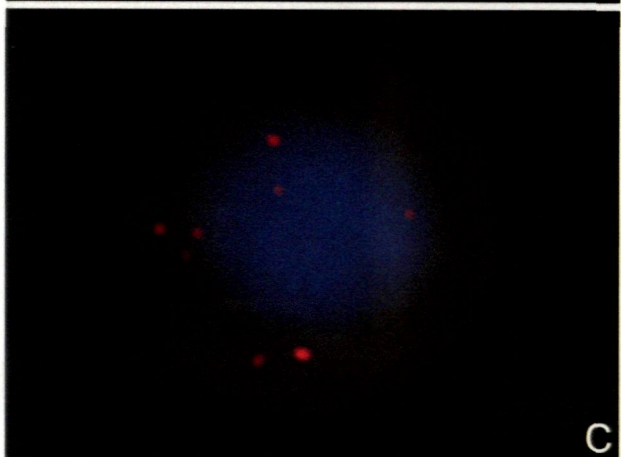
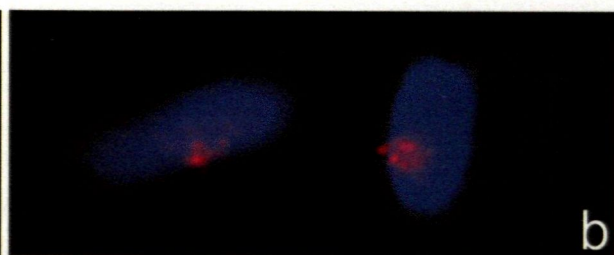
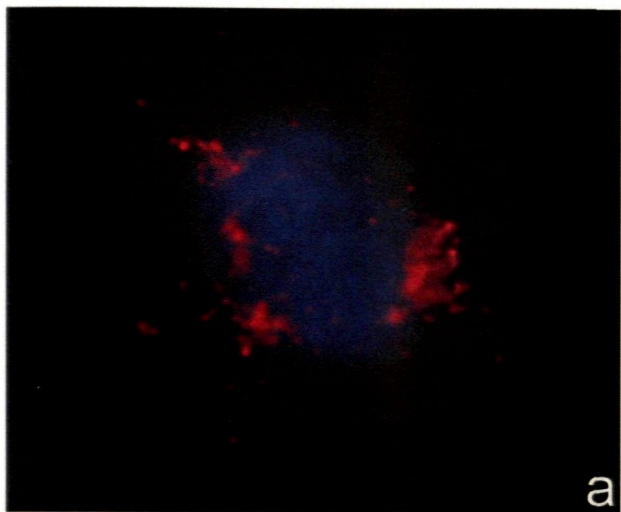
$$IC = \frac{2R}{R + G}$$



### **Figura 38**

**Experimentos para la Detección de Roturas en el ADN mediante FISH (DBD-FISH) sobre linfocitos y espermatozoides de cerdo (*Sus domesticus*) y oveja (*Ovis aries*).**

- a) linfocito de cerdo doméstico de raza Ibérica hibridado con una sonda de ADN genómico del mismo individuo revelada en rojo (R). Se observan abundantes señales de hibridación.
- b) espermatozoides de cerdo doméstico de raza Ibérica hibridados con una sonda de ADN genómico del mismo individuo revelada en R. Se observan una leve señal de hibridación.
- c) linfocitos de oveja de raza Castellana hibridados con una sonda de ADN genómico del mismo individuo revelada en R. Se observan señales discretas de hibridación.
- d) espermatozoides de oveja de raza Castellana hibridados con una sonda de ADN genómico del mismo individuo revelada en R. Se observan abundantes señales de hibridación.





### **Figura 39**

**Resultados de dos experimentos de Hibridación genómica Comparativa-Completa (W-CGH) y Hibridación Genómica Comparativa-Completa para la Detección de Roturas en el ADN (DBD-W-CGH) sobre linfocitos y espermatozoides de cerdo (*Sus domesticus*) y oveja (*Ovis aries*).**

La fila superior muestra los experimentos realizados sobre células de cerdo, y la inferior sobre oveja.

a) Metafase de un cerdo de raza Landrace/Large White sobre la que se han comparado, empleando W-CGH, los genomas de un individuo de raza Ibérica (I) marcado para ser revelado en rojo (R) y de otro de raza Landrace/Large White (L) en verde (G) mediante la Sonda Híbrida (SH): I-R/L-G W-CGH. Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la fluorescencia azul de la contratinción con DAPI. Las regiones centroméricas del subgenoma acrocéntrico muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G), y las del subgenoma metacéntrico fluorescencia predominante R (de I-R).

b) detalle de un cromosoma metacéntrico (arriba) y otro acrocéntrico extraídos de (a).

c) linfocito de cerdo de raza Landrace/Large White desnaturalizado en álcali sobre el que se ha hibridado la Sonda Híbrida: I-R/L-G mediante DBD-W-CGH. Aparece abundante señal de fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G).

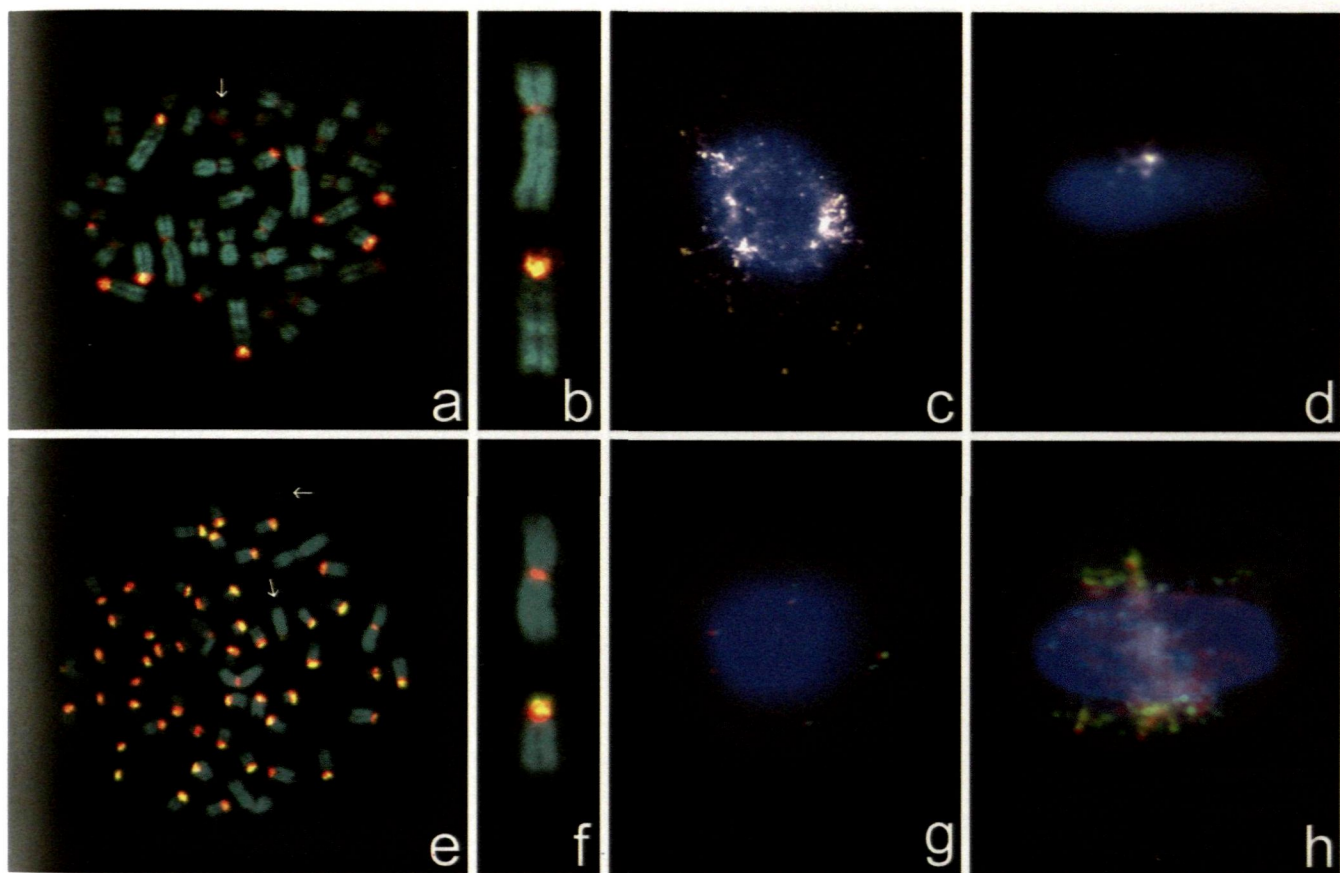
d) espermatozoide de cerdo de raza Landrace/Large White desnaturalizado en álcali sobre el que se ha hibridado la Sonda Híbrida: I-R/L-G mediante DBD-W-CGH. Aparecen señales discretas de fluorescencia amarillo-anaranjado (R + G).

e) Metafase una oveja de raza Castellana sobre la que se han comparado, empleando W-CGH, los genomas de un individuo de raza Assaf (AS) marcado para ser revelado en rojo (R) y de otro de raza Castellana (CA) en verde (G) mediante la SH: AS-R/CA-G. Los brazos cromosómicos muestran fluorescencia amarillo-anaranjada (R + G) apantallada bajo la fluorescencia azul de la contratinción con DAPI. Las regiones centroméricas del subgenoma acrocéntrico y los cromosomas sexuales (*flechas*), muestran fluorescencia predominante R (de AS-R) en la región proximal del bloque de heterocromatina centromérica, y fluorescencia G (de CA-G) en la región distal, y las del subgenoma metacéntrico fluorescencia predominante R (de AS-R).

f) linfocito de oveja de raza Castellana desnaturalizado en álcali sobre el que se ha hibridado la Sonda Híbrida: AS-R/CA-G mediante DBD-W-CGH. Aparecen señales adyacentes de fluorescencia en R y en G, y alguna señal esporádica exclusivamente en R o en G.

g) espermatozoide de oveja de raza Castellana desnaturalizado en álcali sobre el que se ha hibridado la Sonda Híbrida: AS-R/CA-G mediante DBD-W-CGH. Aparece fuertes señales de fluorescencia en R y en G.



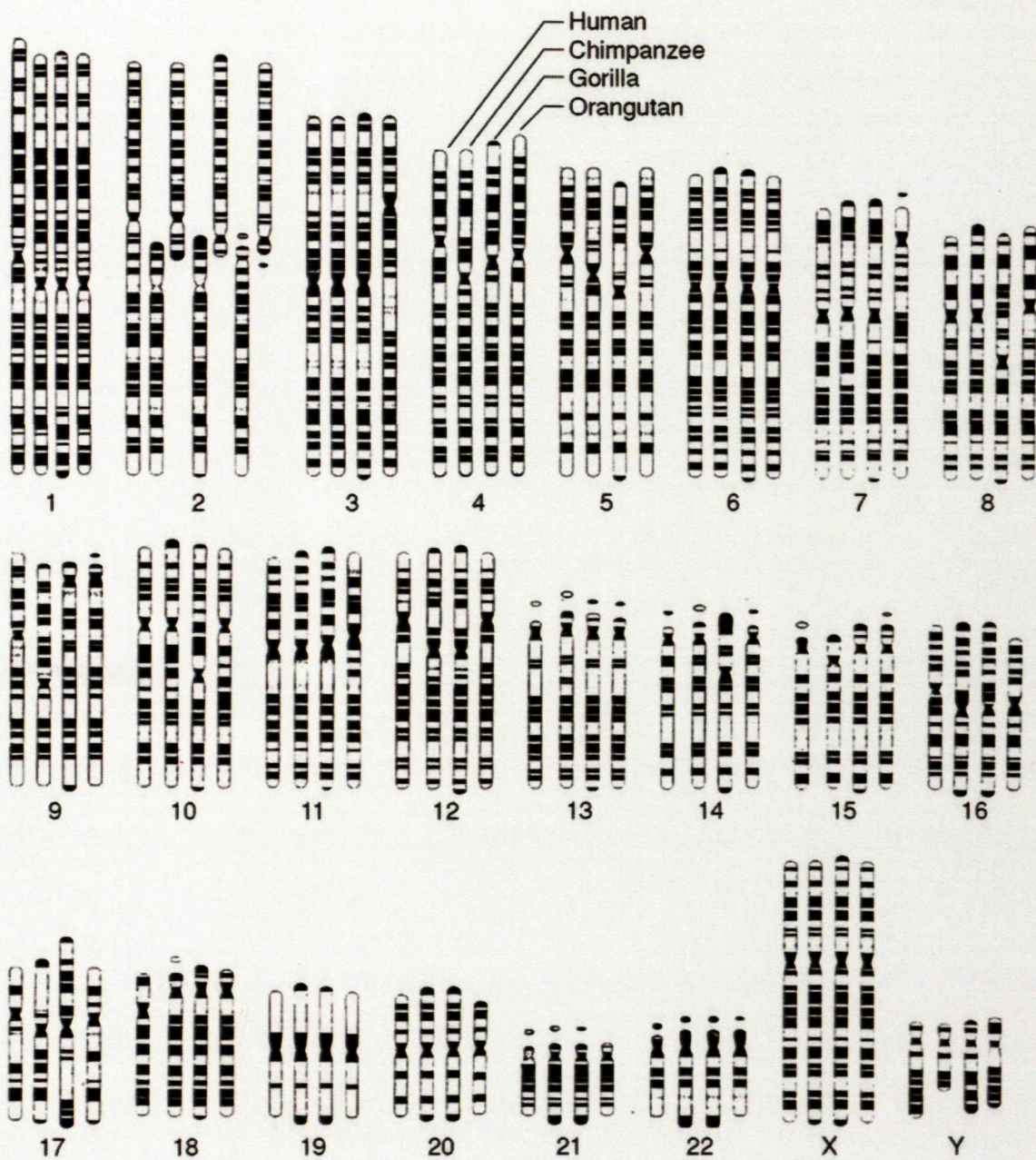


**Figura 40**

**Comparación de los cariotipos de hombre, chimpancé, gorila y orangután.**

Existe una gran semejanza entre los cariotipos de las cuatro especies. El número cromosómico del hombre es  $2n=46$  y el del resto de los homínidos  $2n=48$  debido a una fusión telomérica ocurrida entre dos cromosomas acrocéntricos para dar lugar al cromosoma 2.





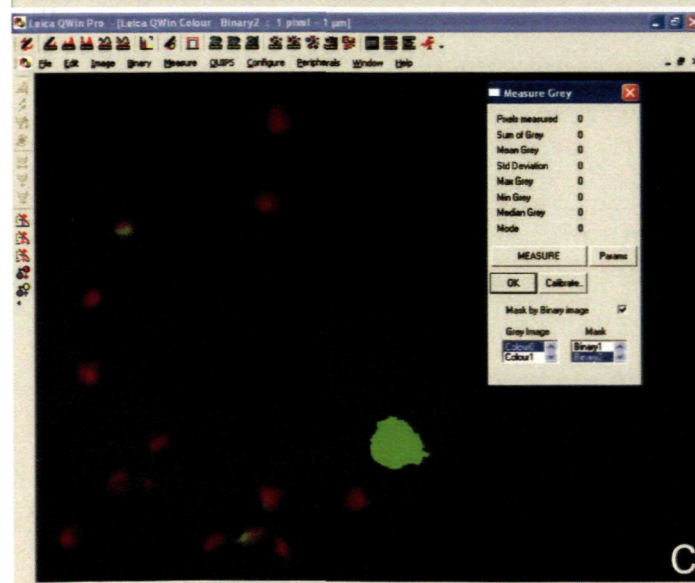
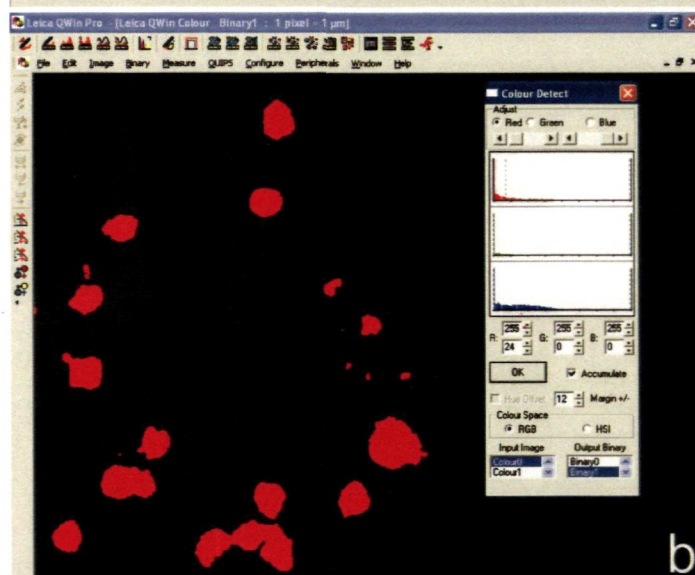
Extraído de Yunis y col. 1980.

**Figura 41**

**Analisis Digital de Imágenes (DIA) (1)**

Imágenes de un ejemplo del proceso de DIA para el cálculo de la relación  $R/G$  (o  $G/R$ ).

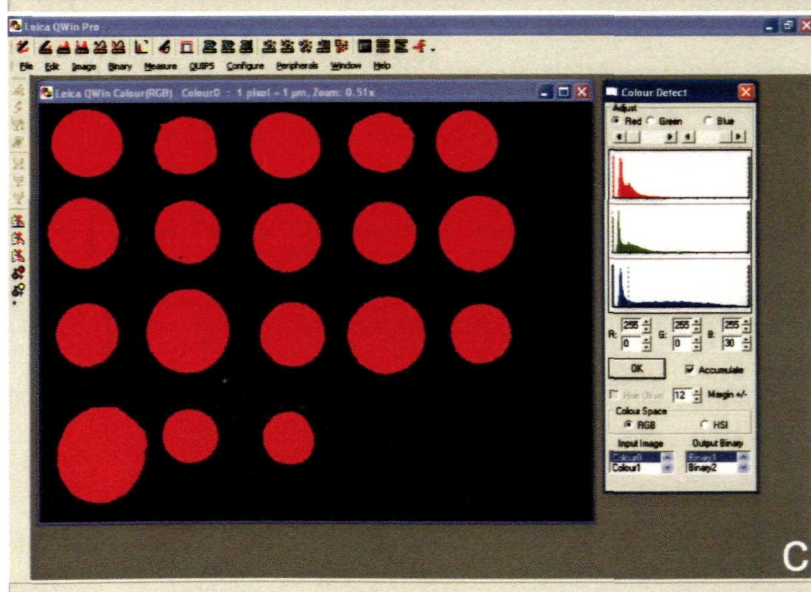
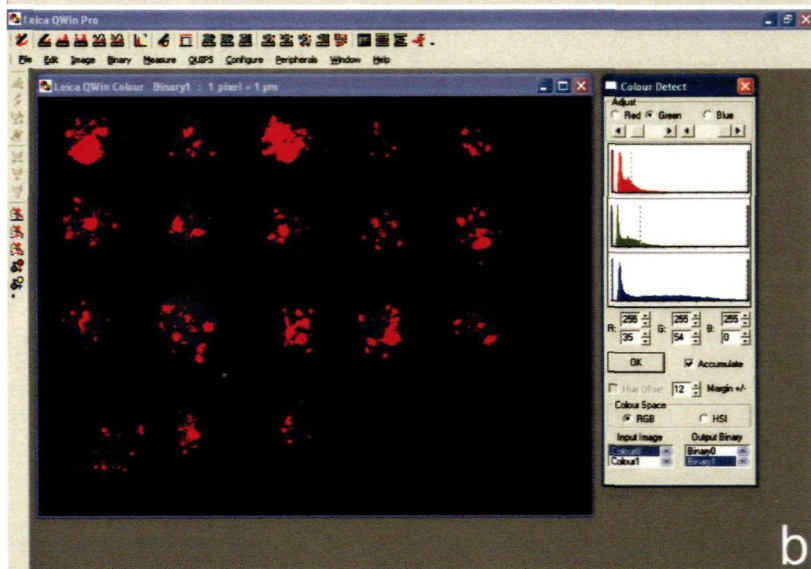
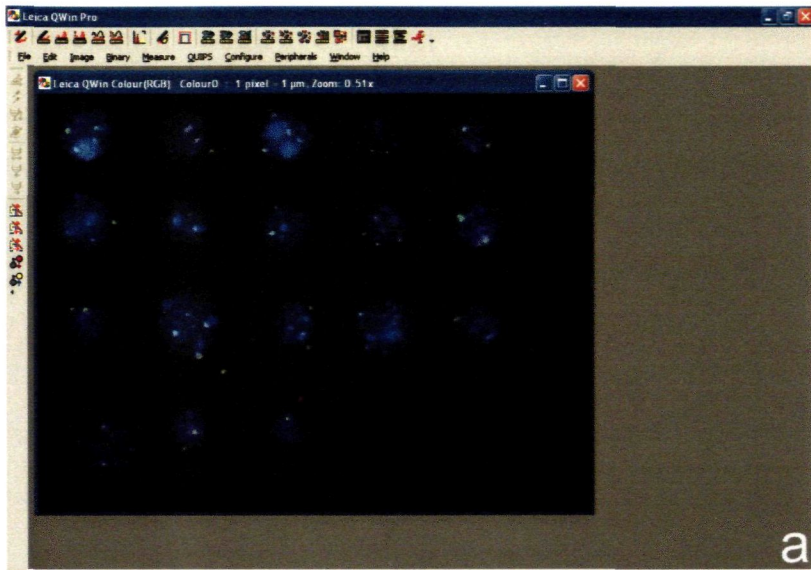




#### **Figura 42**

##### **Analisis Digital de Imágenes (DIA) (2)**

Imágenes de un ejemplo del proceso de DIA para el cálculo de la relación R/B (o G/B)  
(También válido para el cálculo de la Identidad Citogenética [IC]).





## **ANEXO 1**

## **9 ANEXO 1: Relación de Sondas Híbridas (SHs) y preparaciones**

### **9.1 *Homo sapiens***

#### ***Caracterización de los polimorfismos***

Se emplearon SHs en las que se combinaron ADNs genómicos de 10 individuos (5 mujeres y 5 varones) escogidos al azar y comparados dos a dos (siempre varón contra mujer). Estas SHs (15µl) se hibridaron sobre preparaciones de linfocitos fijados en *carnoy* extraídos de los mismos individuos.

#### ***Polimorfismos en los bloques de heterocromatina de los cromosomas 9-9'***

SH: ADN genómico de Mujer (M) marcado con digoxigenina para ser revelado en verde (G) (M-G) y ADN genómico de Varón (V) marcado con biotina para ser revelado en rojo (R) (V-R): M-G/V-R (15µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V.

SH: ADN genómico de M marcado con biotina para ser revelado en rojo R (M-R) y ADN genómico de V marcado con digoxigenina para ser revelado en G (V-G): M-R/V-G (15µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V.

#### ***Caracterización de los individuos mediante un “Código Celular” (CC) y cuantificación del quimerismo (artificial)***

Se emplearon sondas comerciales (Appligene Oncor) para la detección del satélite III del cromosoma 9 (marcada con digoxigenina y revelada en G) (1µl de sonda + 9 µl de Mezcla de Hibridación), y para la detección del satélite-alfa del cromosoma X (marcada con biotina y revelada en R) (1µl de sonda + 9 µl de Mezcla de Hibridación), hibridadas sobre distintos juegos de preparaciones con linfocitos de M y F fijados en *carnoy*:

-Un juego para el cálculo del “Código Celular” para el que se utilizaron preparaciones tanto de M como de F, independientemente.

-Otra serie de preparaciones para la evaluación del quimerismo artificial, en las que se mezclaron los cultivos celulares de M y de V en tres proporciones conocidas: M1:V1, M2:V1, M3:V1 (Hibridaciones repetidas en tres ocasiones para cada proporción).

### **9.2 *Sus domesticus***

Cada experimento se repitió dos veces empleando individuos diferentes.

### *Controles*

SH: ADN genómico de cerdo (*Sus domesticus*) de raza Duroc marcado con biotina para ser revelado en R (DU-R) y ADN genómico de cerdo de raza Duroc marcado con digoxigenina para ser revelado en G (DU-G): DU-R/DU-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdo de raza Duroc.

SH: ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcado con biotina para ser revelado en R (I-R) y ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcado con digoxigenina para ser revelado en G (I-G): I-R/I-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdo de raza Ibérica.

SH: ADN genómico de cerdo de raza híbrida Landrace/Large White marcado con biotina para ser revelado en R (L-R) y ADN genómico de cerdo de raza híbrida Landrace/Large White marcado con digoxigenina para ser revelado en G (L-G): L-R/L-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdo de raza Ibérica.

### *Raza Ibérica vs. raza Duroc*

SH: ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcado con biotina para ser revelado en R (I-R) y ADN genómico de cerdo de raza Duroc marcado con digoxigenina para ser revelado en G (DU-G): I-R/DU-G (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdos de raza Ibérica y Duroc.

SH: ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcado con digoxigenina para ser revelado en G (I-G) y ADN genómico de cerdo de raza Duroc marcado con biotina para ser revelado en R (DU-R) (DU-G): I-G/DU-R (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdos de raza Ibérica y Duroc.

### *Raza Ibérica vs. raza Landrace/Large White*

SH: ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcado con biotina para ser revelado en R (I-R) y ADN genómico de cerdo de raza híbrida Landrace/Large White marcado con digoxigenina para ser revelado en G (L-G): I-R/L-G (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdos de raza Ibérica y Landrace/Large White.

SH: ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcado con digoxigenina para ser revelado en G (I-G) y ADN genómico de cerdo de raza híbrida Landrace/Large White marcado con biotina para ser revelado en R (L-R): I-G/L-R (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdos de raza Ibérica y Landrace/Large White.

### *Raza Landrace/Large White vs. raza Duroc*

SH: ADN genómico de cerdo de raza híbrida Landrace/Large White marcado con biotina para ser revelado en R (L-R) y ADN genómico de cerdo de raza Duroc marcado con digoxigenina para ser revelado en G (DU-G): L-R/DU-G (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdos de raza Duroc y Landrace/Large White.

SH: ADN genómico de cerdo de raza híbrida Landrace/Large White marcado con digoxigenina para ser revelado en G (L-G) y ADN genómico de cerdo de raza Duroc marcado con biotina para ser revelado en R (DU-R): L-G/DU-R (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* de cerdos de raza Duroc y Landrace/Large White.

### 9.3 El género *Microtus*

#### *Localización física de MSAT-160 en Microtus cabreræ y Microtus nivalis*

Plásmido pUC-19 conteniendo la secuencia MSAT-160 de CAB (MSAT-CAB), marcado con biotina para ser revelado en R (MSAT-CAB-R) (15 µl) hibridado sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB y NIV mezclados.

Plásmido pGEM conteniendo la secuencia MSAT-160 de NIV (MSAT-NIV), marcado con biotina para ser revelado en R (MSAT-NIV-R) (15 µl) hibridado sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB y NIV mezclados.

#### *Microtus cabreræ vs. Microtus nivalis*

SH: ADN genómico de *Microtus cabreræ* (CAB) marcado con biotina para ser revelado en R (CAB-R) y ADN genómico de *Microtus nivalis* (NIV) marcado con digoxigenina para ser revelado en G (NIV-G): CAB-R/NIV-G (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB, de NIV y de CAB y NIV mezclados.

SH: ADN genómico de CAB marcado con digoxigenina para ser revelado en G (CAB-G) y ADN genómico de NIV marcado con biotina para ser revelado en R (NIV-R): CAB-G/NIV-R (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB, de NIV y de CAB y NIV mezclados.

#### *Microtus cabreræ vs. Microtus nivalis en presencia de MSAT-CAB*

SH: CAB-R/NIV-G (10 µl) más MSAT-CAB marcado con digoxigenina para ser revelado en G (MSAT-CAB-G) (5 µl), hibridadas sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB y NIV mezclados.

SH: CAB-R/NIV-G (10 µl) más MSAT-CAB-R (5 µl), hibridadas sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB y NIV mezclados.

#### *Microtus cabreræ vs. Microtus nivalis en presencia de MSAT-NIV*

SH: CAB-R/NIV-G (10 µl) más MSAT-NIV marcado con digoxigenina para ser revelado en G (MSAT-NIV-G) (5 µl), hibridadas sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB y NIV mezclados.

SH: CAB-R/NIV-G (10 µl) más MSAT-NIV-R (5 µl), hibridadas sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB y NIV mezclados.

SH: CAB-R/NIV-G (10 µl) más MSAT-NIV marcado con digoxigenina para ser revelado en G (MSAT-NIV-G) (5 µl), hibridadas sobre linfocitos fijados en *carnoy* de CAB y NIV mezclados.

#### 9.4 El género *Arcyptera*

SH: ADN genómico de *Arcyptera tornosi* (AT) marcado con digoxigenina para ser revelado en G (AT-G) y ADN genómico de *Arcyptera fusca* (AF) marcado con biotina para ser revelado en R (AF-R): AT-G/AF-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en etanol:ácido acético (3:1) de *Arcyptera tornosi* y *Arcyptera fusca*, independientemente.

SH: ADN genómico de AT, marcado con biotina para ser revelado en R (AT-R) y ADN genómico de AF marcado con digoxigenina para ser revelado en G (AF-G): AT-R/AF-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en etanol:ácido acético (3:1) de *Arcyptera tornosi* y *Arcyptera fusca*, independientemente.

#### 9.5 *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla* y *Chlorocebus aethiops*

##### *Homo sapiens* vs. *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla* y *Chlorocebus aethiops*

SH: ADN genómico de un Varón de la especie *Homo sapiens* (V2), marcado con digoxigenina para ser revelado en G (V2-G) y ADN genómico de V2 marcado con biotina para ser revelado en R (V2-R): V2-G/V2-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de V2 marcado con digoxigenina para ser revelado en G (V2-G) y ADN genómico de una mujer de la especie *Homo sapiens* (M2) marcado con biotina para ser revelado en R (M2-R): V2-G/M2-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de V2 marcado con biotina para ser revelado en R (V2-R) y ADN genómico de M2 marcado con digoxigenina para ser revelado en G (M2-G): V2-R/M2-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de V2 marcado con digoxigenina para ser revelado en G (V2-G) y ADN genómico de Chimpancé (*Pan troglodytes*) (CH) marcado con biotina para ser revelado en R (CH-R): V2-G/CH-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de V2 marcado con biotina para ser revelado en R (V2-R) y ADN genómico de CH marcado con digoxigenina para ser revelado en G (CH-G): V2-R/CH-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de V2 marcado con digoxigenina para ser revelado en G (V2-G) y ADN genómico de Gorila (*Gorilla gorilla*) (GO) marcado con biotina para ser revelado en R (GO-R): V2-G/GO-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de V2 marcado con biotina para ser revelado en R (V2-R) y ADN genómico de GO marcado con digoxigenina para ser revelado en G (GO-G): V2-R/GO-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.



SH: ADN genómico de V2 marcado con digoxigenina para ser revelado en G (V2-G) y ADN genómico de Mono Verde (*Chlorocebus aethiops*) (MV) marcado con biotina para ser revelado en R (MV-R): V2-G/MV-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de V2 marcado con biotina para ser revelado en R (V2-R) y ADN genómico de MV marcado con digoxigenina para ser revelado en G (MV-G): V2-R/MV-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

### *Pan troglodytes, Gorilla gorilla y Chlorocebus aethiops*

SH: ADN genómico de CH marcado con biotina para ser revelado en R (CH-R) y ADN genómico de GO marcado con digoxigenina para ser revelado en G (GO-G): CH-R/GO-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de CH marcado con digoxigenina para ser revelado en G (CH-G) y ADN genómico de GO marcado con biotina para ser revelado en R (GO-R): CH-G/GO-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de CH marcado con biotina para ser revelado en R (CH-R) y ADN genómico de MV marcado con digoxigenina para ser revelado en G (MV-G): CH-R/MV-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de CH marcado con digoxigenina para ser revelado en G (CH-G) y ADN genómico de MV marcado con biotina para ser revelado en R (MV-R): CH-G/MV-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de GO marcado con biotina para ser revelado en R (GO-R) y ADN genómico de MV marcado con digoxigenina para ser revelado en G (MV-G): GO-R/MV-G (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

SH: ADN genómico de GO marcado con digoxigenina para ser revelado en G (GO-G) y ADN genómico de MV marcado con biotina para ser revelado en R (MV-R): GO-G/MV-R (15 µl), hibridada sobre linfocitos fijados en *carnoy* de V2.

## **9.6 Aplicación de la W-CGH para la localización y caracterización de Lugares Lábil Alcalinos (LLA)**

### *Sus domesticus*

Sonda de ADN genómico de cerdo (*Sus domesticus*) de raza Ibérica marcado para ser revelada en R, hibridada sobre linfocitos y espermatozoides del mismo individuo incluidos en microgeles y desnaturalizados en álcali.

Sonda de ADN genómico de cerdo de raza Landrace/Large White marcado para ser revelada en R, hibridada sobre linfocitos y espermatozoides del mismo individuo incluidos en microgeles y desnaturalizados en álcali.

SH: ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcado con biotina para ser revelado en R (I-R) y ADN genómico de cerdo de raza híbrida Landrace/Large White marcado con digoxigenina para ser revelado en G (L-G): I-R/L-G (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* y linfocitos y espermatozoides sin fijar incluidos en microgeles y desnaturalizados en álcali.

SH: ADN genómico de cerdo de raza Ibérica marcado con digoxigenina para ser revelado en G (I-G) y ADN genómico de cerdo de raza híbrida Landrace/Large White marcado con biotina para ser revelado en G (L-G): I-G/L-R (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* y linfocitos y espermatozoides sin fijar incluidos en microgeles y desnaturalizados en álcali.

### *Ovis aries*

Sonda de ADN genómico de oveja (*Ovis aries*) de raza Castellana marcado para ser revelada en R, hibridada sobre linfocitos y espermatozoides del mismo individuo incluidos en microgeles y desnaturalizados en álcali.

Sonda de ADN genómico de oveja (*Ovis aries*) de raza Assaf marcado para ser revelada en R, hibridada sobre linfocitos y espermatozoides del mismo individuo incluidos en microgeles y desnaturalizados en álcali.

SH: ADN genómico de oveja de raza Assaf marcado con biotina para ser revelado en R (A-R) y ADN genómico de oveja de raza Castellana marcado con digoxigenina para ser revelado en G (C-G): A-R/C-G (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* y linfocitos y espermatozoides sin fijar incluidos en microgeles de oveja.

SH: ADN genómico de oveja de raza Assaf marcado con digoxigenina para ser revelado en G (A-G) y ADN genómico de oveja de raza Castellana marcado con biotina para ser revelado en R (C-R): A-G/C-R (15 µl), hibridada independientemente sobre linfocitos fijados en *carnoy* y linfocitos y espermatozoides sin fijar incluidos en microgeles de oveja.

## **ANEXO 2**

## 10 **ANEXO 2: Análisis Digital de Imágenes (DIA)**

### *Estimación de la relación R/G (o G/R) de una determinada región*

Sobre la imagen a estudiar (Fig. 41a) se *detectan* automáticamente las áreas que se encuentran dentro de los rangos de valores de rojo (R) y verde (G) preestablecidos (Fig 41b), mediante el soporte informático Leica QWin Pro. En este caso hipotético, las regiones centroméricas se encuentran dentro de dichos rangos y por tanto sobre éstas queda dibujada una imagen binaria (*máscara* roja) (Fig 41b). El programa medirá los valores de R y G que se encuentren bajo la esta *máscara*.

Si se desea cuantificar los valores de sólo una región centromérica concreta, ésta se selecciona manualmente de entre las *detectadas* (*máscara* verde) (Fig 41c). Entonces se medirán exclusivamente los valores de R y G de la fracción de la imagen que queda bajo la nueva *máscara*.

Para el cálculo de G/R (o R/G), los valores obtenidos de R y G se procesarán a continuación con un programa de cálculo al que se exportan.

### *Estimación de la relación R/B (o G/B)*

Sobre la imagen a estudiar (Fig 42a) se *detectan* automáticamente las áreas que se encuentran dentro del rango de valores de G (o R) de interés, dibujando una imagen binaria (Fig 42b). Bajo esta *máscara* se miden los valores de G (o R). Independientemente se *detecta* toda la cromatina de la interfase y se crea una *máscara* (Fig 42c), de esta manera se medirán los valores de azul (B) que se encuentren bajo ésta.

Para el cálculo de G/B (o R/B), los valores obtenidos de R y B se procesarán a continuación con un programa de cálculo al que se exportan.

### *Estimación de la Identidad Citogenética (IC)*

Sobre la imagen a estudiar (Fig 42a) se *detecta* automáticamente toda la región de la interfase y se crea una imagen binaria (Fig 42c). Bajo esta *máscara* se miden los valores de G y R.

Para el cálculo de la IC a partir de los valores de R y G medidos, estos se exportan a un programa de cálculo en el que se procesan.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 11 **BIBLIOGRAFÍA**

Adams MD, Celniker SE, Holt RA y col. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000; 287: 2185-2195.

Adega F, Chaves R, Guedes-Pinto H. Chromosome restriction enzyme digestion in domestic pig (*Sus scrofa*) constitutive heterochromatin arrangement. *Genes Genet Syst* 2005; 80: 49-56.

Alexandrov IA, Mitkevich SP, Yurov YB. The phylogeny of human chromosome specific alpha satellites. *Chromosoma* 1988; 96: 443-453.

Alexandrov I, Kazakov A, Tumeneva I y col. Alpha-satellite DNA of primates: old and new families. *Chromosoma* 2001; 110: 253-266.

Alizadeh M, Bernard M, Danic B y col. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; 99: 4618-4625.

Antin JH, Childs R, Filipovich AH y col. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 473-485.

Archidiacono N, Antonacci R, Marzella R y col. Comparative mapping of human alphoid sequences in great apes using fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 1995; 25: 477-484.

Arnason U, Gullberg A, Burguete AS y col. Molecular estimates of primate divergences and new hypotheses for primate dispersal and the origin of modern humans. *Hereditas* 2000; 133: 217-228.

Arthur CK, Apperley JF, Guo AP y col. Cytogenetic events after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 1988; 71: 1179-1186.

Bader P, Holle W, Klingebiel T y col. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 697-702.

Bader P, Niethammer D, Willasch A y col. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 107-119.

Bailey JA, Yavor AM, Massa HF y col. Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 2001; 11: 1005-1017.

Bailey JA, Gu Z, Clark RA y col. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 2002; 297: 1003-1007.

Bar BM, Schattenberg A, Van Dijk BA y col. Host and donor erythrocyte repopulation patterns after allogeneic bone marrow transplantation analysed with antibody-coated fluorescent microspheres. *Br J Haematol* 1989; 72: 239-245.

Barker PE, Mohandas T, Kaback MM. Chromosome polymorphisms in karyotypes from amniotic fluid cell cultures. *Clin Genet* 1977; 11: 243-248.

Bedford JM, Calvin HI. The occurrence and possible functional significance of -S-S-crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 1974; 188: 137-155.

Bernard P, Maure JF, Partridge JF y col. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 2001; 294: 2539-2542.

Bianchi MS, Bianchi NO, Pantelias GE y col. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. *Chromosoma* 1985; 91: 131-136.

Bianchi NO, Ayres J. Polymorphic patterns of heterochromatin distribution in guinea pig chromosomes 1971; 34: 254-260.

Bianchi NO, Bianchi MS. Analysis of the eukaryotic chromosome organization with restriction endonucleases. Berlin, Springer, 1987.

Blazar BR, Orr HT, Arthur DC y col. Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1985; 66: 1436-1444.

Boveri T. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh Phys Med Gesellschaft Würzburg* 1902; 35: 67-90.

Bradley RD, Wichman HA. Rapidly evolving repetitive DNAs in a conservative genome: a test of factors that affect chromosomal evolution. *Chromosome Res* 1994; 2: 354-360.

Britten RJ, Davidson EH. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* 1969; 165: 349-357.

Britten RJ. Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 5992-5996.

Brown TA. Genomes Anatomies. BIOS Scientific Publisher Ltd, 2002.

Brown WM, Prager EM, Wang A y col. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J Mol Evol* 1982; 18: 225-239.

Brutlag DL. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annu Rev Genet* 1980; 14: 121-144.

Buño I, Díez-Martín JL, López-Fernández C y col. Polymorphisms for the size of heterochromatic regions allow sex-independent quantification of post-BMT chimerism targeting metaphase and interphase cells. *Haematologica* 1999a; 84: 138-141.

Buño I, de la Torre J, Torroja E y col. Chimerism quantification after sex-matched BMT: how probable is it to find donor/recipient pairs with distinguishable cells? *Cancer Genet Cytogenet* 1999b; 113: 152-155.

Buño I, Anta B, Moreno-López E y col. Lineage-specific chimaerism quantification after T-cell depleted peripheral blood stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 659-667.

Buño I, Nava P, Simón A y col. A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Haematologica* 2005; 90: 1373-1379.

Caccone A, Powell JR. DNA divergence among hominoids. *Evolution* 1989; 43: 926-942.

Cáceres M, Lachuer J, Zapala MA y col. Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13030-13035.

Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT y col. Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 1992; 29: 299-307.

Caspersson T, Farber S, Foley GE y col. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1968; 49: 219-222.

Caspersson T, Lomakka G, Zech L. The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes - distinguishing characters and variability. *Hereditas* 1972; 67: 89-102.

Corneo G, Ginelli E, Polli E. A satellite DNA isolated from human tissues. *J Mol Biol* 1967; 23: 619-622.

Corneo G, Ginelli E, Polli E. Repeated sequences in human DNA. *J Mol Biol* 1970; 48: 319-327.

Corneo G, Ginelli E, Polli E. Renaturation properties and localization in heterochromatin of human satellite DNA's. *Biochim Biophys Acta* 1971; 247: 528-534.

Corneo G, Zardi L, Polli E. Elution of human satellite DNAs on a methylated albumin kieselguhr chromatographic column: isolation of satellite DNA. IV. *Biochim Biophys Acta* 1972; 269: 201-204.

Correns C. G. Mendels Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 1900; 18: 158-168.

Craig-Holmes AP, Moore FB, Shaw MW. Polymorphism of human C-band heterochromatin. I. Frequency of variants. *Am J Hum Genet* 1973; 25: 181-192.

Cremer T, Lichter P, Borden J y col. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 1988; 80: 235-246.

Csank AK, Henikoff S. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet* 1998; 14: 200-204.

Currie P. Human genetics: muscling in on hominid evolution. *Nature* 2004; 428: 373-374.

Chaline J, Dutrillaux B, Coutourier J y col. Un modèle cromosomique e paléobiogéographique d'évolution des primates supérieurs. *Geobios* 1991; 24: 105-110.

Chapman HM, Bruere AN. Chromosome morphology during meiosis of normal and Robertsonian translocation-carrying rams (*Ovis aries*). *Can J Genet Cytol* 1977; 19: 93-102.

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994; 371: 215-220.

Chaudhuri JP, Vogel W, Voiculescu I y col. A simplified method of demonstrating Giemsa-band pattern in human chromosomes. *Humangenetik* 1971; 14: 83-84.

Chen FC, Vallender EJ, Wang H y col. Genomic divergence between human and chimpanzee estimated from large-scale alignments of genomic sequences. *J Hered* 2001; 92: 481-489.

Chu EH, Bender MA. Cytogenetics and evolution of primates. *Ann N Y Acad Sci* 1962; 102: 253-266.

Darwin C. On the Origin of Species. London, John Murray, 1859.

Darwin C. The variation of animals and plants under domestication. London, John Murray, 1868.

Dewald GW, Schad CR, Christensen ER y col. Fluorescence in situ hybridization with X and Y chromosome probes for cytogenetic studies on bone marrow cells after opposite sex transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 149-154.

Dover GA. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet* 1986; 2: 159-165.

Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G y col. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999; 13: 2059, 2060-2059.

Durnam DM, Anders KR, Fisher L y col. Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. *Blood* 1989; 74: 2220-2226.

Dutrillaux B, Lejeune J. A new technic of analysis of the human karyotype. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1971; 272: 2638-2640.

Dutrillaux B, Couturier J, Sabatier L y col. Inversions in evolution of man and closely related species. *Ann Genet* 1986; 29: 195-202.

Ebersberger I, Metzler D, Schwarz C y col. Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1490-1497.

Elder JF, Jr., Turner BJ. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* 1995; 70: 297-320.

Elmaagacli AH, Runkel K, Steckel N y col. A comparison of chimerism and minimal residual disease between four different allogeneic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 809-815.

Enard W, Khaitovich P, Klose J y col. Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* 2002; 296: 340-343.

Fernández JL, Valverde D, Goyanes V y col. AluI in situ digestion of human alphoid and classical satellite DNA regions: high-resolution digital image analysis of FISH signals from condensed and extended chromatin. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 76: 94-100.

Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J y col. Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 82: 251-256.

Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Rivero MT y col. Evidence of abundant constitutive alkali-labile sites in human 5 bp classical satellite DNA loci by DBD-FISH. *Mutat Res* 2001b; 473: 163-168.

Fernández R, Barragán MJ, Bullejos M y col. Molecular and cytogenetic characterization of highly repeated DNA sequences in the vole *Microtus cabreræ*. *Heredity* 2001a; 87: 637-646.

Forozan F, Karhu R, Kononen J y col. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997; 13: 405-409.



Fowler JC, Skinner JD, Burgoyne LA y col. Satellite DNA and higher-primate phylogeny. *Mol Biol Evol* 1989; 6: 553-557.

Gagneux P, Varki A. Genetic differences between humans and great apes. *Mol Phylogenet Evol* 2001; 18: 2-13.

Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 63: 378-383.

García F, Nogues C, García M y col. Characterization of constitutive heterochromatin in *Cebus apella* (Cebidae, Primates) and *Pan troglodytes* (Hominidae, Primates): comparison to human chromosomes. *Am J Primatol* 1999; 49: 205-221.

Gebhart E. Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104: 352-358.

Gerhard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC y col. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 3755-3759.

Gissi C, Reyes A, Pesole G y col. Lineage-specific evolutionary rate in mammalian mtDNA. *Mol Biol Evol* 2000; 17: 1022-1031.

Giuffra E, Kijas JM, Amarger V y col. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 2000; 154: 1785-1791.

Glazko GV, Nei M. Estimation of divergence times for major lineages of primate species. *Mol Biol Evol* 2003; 20: 424-434.

Glazko G, Veeramachaneni V, Nei M y col. Eighty percent of proteins are different between humans and chimpanzees. *Gene* 2005; 346: 215-219.

Goldberg IG, Sawhney H, Pluta AF y col. Surprising deficiency of CENP-B binding sites in African green monkey alpha-satellite DNA: implications for CENP-B function at centromeres. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5156-5168.

Goodman M. Evolution of the immunologic species specificity of human serum proteins. *Hum Biol* 1962; 34: 104-150.

Goodman M. A Record Of Man's Evolution In The Soluble Proteins Of Blood. *Vox Sang* 1963a; 8: 505.

Goodman M. Serological Analysis Of The Systematics Of Recent Hominoids. *Hum Biol* 1963b; 35: 377-436.

Goodwin E, Meyne J. Strand-specific FISH reveals orientation of chromosome 18 alphoid DNA. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 63: 126-127.

Gosálvez J, López-Fernández C, Morales-Agacino E. The chromosome system in three species of the genus *Arcyptera* (Orthoptera). I C-banding, DNA content and NOR activity. *Acrida* 1981; 10: 191-203.

Grimwood J, Gordon LA, Olsen A y col. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* 2004; 428: 529-535.

Gustavsson I. Standard karyotype of the domestic pig. Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig. *Hereditas* 1988; 109: 151-157.

Haaf T, Schmid M. Chromosome heteromorphisms in the gorilla karyotype. Analyses with distamycin A/DAPI, quinacrine and 5-azacytidine. *J Hered* 1987; 78: 287-292.

Hall BD, Spiegelman S. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1961; 47: 137-163.

Harper ME, Saunders GF. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 1981; 83: 431-439.

Hauge M, Poulsen H, Halberg A y col. The value of fluorescence markers in the distinction between maternal and fetal chromosomes. *Humangenetik* 1975; 26: 187-191.

Heitz E. Das Heterochromatin der Moose. *Wissensch Bot* 1928; 69: 762-818.

Henikoff S, Ahmad K, Malik HS. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 2001; 293: 1098-1102.

Hennig W. Phylogenetic Systematics. Urbana, IL, University of Illinois Press, 1966.

Hirszfeld L, Hirszfeld H. Essai d'application des méthodes au problème des races. *Anthropologie* 1919; 29: 505-537.

Horai S, Hayasaka K, Kondo R y col. Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 532-536.

Hsu TC, Arrighi FE. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. *Chromosoma* 1971; 34: 243-253.

Huxley TH. Evidence as to Man's Place in Nature. London, Williams and Norgate, 1863.

IHGSC (International Human Genome Sequence Consortium), Lander ES, Linton LM y col. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.

Jantsch M, Hamilton B, Mayr B y col. Meiotic chromosome behaviour reflects levels of sequence divergence in *Sus scrofa domestica* satellite DNA. *Chromosoma* 1990; 99: 330-335.

Janzen MA, Buoen LB, Zhao F y col. Characterization of a swine chromosome-specific centromeric higher-order repeat. *Mamm Genome* 1999; 10: 579-584.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 1985; 316: 76-79.

Johannsen W. The genotype conception of heredity. *The American Naturalist* 1911; 45: 129-159.

John B. The biology of heterochromatin. Cambridge, Cambridge University Press, 1988a.

John B, Miklos GLG. The Eukaryote Genome in Development and Evolution. London, Allen and Unwin, 1988b.

Jones KW. Satellite DNA. *J Med Genet* 1973; 10: 273-281.

Kalz L, Schwanitz G. Characterization of constitutive heterochromatin, in particular of fluorescence polymorphisms, in a Central European population. *Int J Hum Genet* 2004; 4: 1-10.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D y col. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J y col. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994a; 91: 2156-2160.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J y col. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994b; 10: 231-243.

Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 1-12.

King MC, Wilson AC. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 1975; 188: 107-116.

Kjeldsen E, Kølvrå S. FISH techniques, FISH probes and their applications in medicine and biology: an overview. Berlin, Springer, 2002.

Koch J. Neocentromeres and alpha satellite: a proposed structural code for functional human centromere DNA. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 149-154.

Lamarck JBD. Philosophie zoologique. Paris, Dentu, 1809.

Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM y col. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 685-691.

Lawler M, Humphries P, McCann SR. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 77: 2504-2514.

Lawler SD, Baker MC, Harris H y col. Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol* 1984; 56: 431-443.

Lee C, Wevrick R, Fisher RB y col. Human centromeric DNAs. *Hum Genet* 1997; 100: 291-304.

Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 203-221.

Li WH. Molecular Evolution. Sunderland, MA, Sinauer, 1997.

Li YC, Lee C, Sanoudou D y col. Interstitial colocalization of two cervid satellite DNAs involved in the genesis of the Indian muntjac karyotype. *Chromosome Res* 2000; 8: 363-373.

Lichter P, Joos S, Bentz M y col. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; 37: 348-357.

Lin CC, Joyce E, Biederman BM y col. The constitutive heterochromatin of porcine chromosomes. *J Hered* 1982; 73: 231-233.

Linn S, Arber W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968; 59: 1300-1306.

Linneo C. Sistema naturae per trie regna naturae. Uppsala, 1735.

López-Fernández C, Gosálvez J. Differential staining of a heterochromatic zone in *Arcytera fusca* (Orthoptera:Acrididae). *Experientia* 1981; 37: 240-241.

López-Fernández C, Gosálvez J. The chromosome system in three species of the genus *Arcyptera*. II. Unstable B chromosomes in *Arcyptera fusca* (Pall). *Genetica* 1983; 62.

Lubs HA, Ruddle FH. Applications of quantitative karyotypy to chromosome variation in 4400 consecutive newborns. Edinburgh, University Press, 1970.

Luke S, Verma RS. Human (*Homo sapiens*) and chimpanzee (*Pan troglodytes*) share similar ancestral centromeric alpha satellite DNA sequences but other fractions of heterochromatin differ considerably. *Am J Phys Anthropol* 1995; 96: 63-71.

Malcolm S, Barton P, Murphy C y col. Chromosomal localization of a single copy gene by in situ hybridization--human beta globin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet* 1981; 45: 135-141.

Malik HS, Henikoff S. Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics* 2001; 157: 1293-1298.

du Manoir S, Schrock E, Bentz M y col. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; 19: 27-41.

Marchal JA, Acosta MJ, Bullejos M y col. A repeat DNA sequence from the Y chromosome in species of the genus *Microtus*. *Chromosome Res* 2004; 12: 757-765.

Marmur J, Lane D. Strand Separation And Specific Recombination In Deoxyribonucleic Acids: Biological Studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960; 46: 453-461.

Maryama T, Imai HT. Evolutionary rate of the mammalian karyotype. *J Theor Biol* 1981; 90: 111-121.

Masumoto H, Masukata H, Muro Y y col. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 1989; 109: 1963-1973.

Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 560-564.

Maynard-Smith J. Overview: unsolved evolutionary problems. London, Academia Press, 1982.

McCann SR, Crampe M, Molloy K y col. Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2005; 32: 55-61.

McConkey EH, Fouts R, Goodman M y col. Proposal for a human genome evolution project. *Mol Phylogenet Evol* 2000; 15: 1-4.

McConkey EH, Goodman M. A Human Genome Evolution Project is needed. *Trends Genet* 1997; 13: 350-351.

McDonald JF. Evolution and consequences of transposable elements. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 855-864.

McGraw RA, Jacobson RJ, Akamatsu M. A male-specific repeated DNA sequence in the domestic pig. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 10389.

McKenzie WH, Lubs HA. Human Q and C chromosomal variations: distribution and incidence. *Cytogenet Cell Genet* 1975; 14: 97-115.

Meselson M, Stahl FW, Vinograd J. Equilibrium Sedimentation Of Macromolecules In Density Gradients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1957; 43: 581-588.

Meselson M, Yuan R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 1968; 217: 1110-1114.



Mewborn SK, Lese Martin C, Ledbetter DH. The dynamic nature and evolutionary history of subtelomeric and pericentromeric regions. *Cytogenet Genome Res* 2005; 108: 22-25.

Michener CD, Sokal RR. A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 1957; 11: 130-162.

Miller JR, Hindkjaer J, Thomsen PD. A chromosomal basis for the differential organization of a porcine centromere-specific repeat. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 62: 37-41.

Min GL, Hibbin J, Arthur C y col. Use of minisatellite DNA probes for recognition and characterization of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1988; 68: 195-201.

Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W y col. The Atlas of European Mammals. London, Poyser, 1999.

Mitchell AR, Gosden JR, Ryder OA. Satellite DNA relationships in man and the primates. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 3235-3249.

Miyamoto MM, Slightom JL, Goodman M. Phylogenetic relations of humans and African apes from DNA sequences in the psi eta-globin region. *Science* 1987; 238: 369-373.

Modi WS. Comparative analyses of heterochromatin in *Microtus*: sequence heterogeneity and localized expansion and contraction of satellite DNA arrays. *Cytogenet Cell Genet* 1993a; 62: 142-148.

Modi WS. Rapid, localized amplification of a unique satellite DNA family in the rodent *Microtus chrotorrhinus*. *Chromosoma* 1993b; 102: 484-490.

Modi WS, Serdyukova NA, Vorobieva NV y col. Chromosomal localization of six repeated DNA sequences among species of *Microtus* (Rodentia). *Chromosome Res* 2003; 11: 705-713.

Montefalcone G, Tempesta S, Rocchi M y col. Centromere repositioning. *Genome Res* 1999; 9: 1184-1188.

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56-61, 64-55.

Murphy WJ, Larkin DM, Everts-van der Wind A y col. Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* 2005; 309: 613-617.

Musser GG, Carleton MD. Family: Muridae. Washington, Smithsonian Institution Press, 1993.

- Najfeld V, Burnett W, Vlachos A y col. Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 829-834.
- Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J y col. Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 1990; 11: 126-131.
- Nevers P, Saedler H. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature* 1977; 268: 109-115.
- Newman TL, Tuzun E, Morrison VA y col. A genome-wide survey of structural variation between human and chimpanzee. *Genome Res* 2005; 15: 1344-1356.
- Nijman IJ, Lenstra JA. Mutation and recombination in cattle satellite DNA: a feedback model for the evolution of satellite DNA repeats. *J Mol Evol* 2001; 52: 361-371.
- Ohno S. So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol* 1972; 23: 366-370.
- Olson SB, Magenis RE, Lovrien EW. Human chromosome variation: the discriminatory power of Q-band heteromorphism (variant) analysis in distinguishing between individuals, with specific application to cases of questionable paternity. *Am J Hum Genet* 1986; 38: 235-252.
- Orgel LE, Crick FH. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 1980; 284: 604-607.
- Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64: 600-604.
- Payne RB. Natural Selection and Social Behavior. New York., Chiron, 1981.
- Peattie DA. Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 1760-1764.
- Petz LD, Yam P, Wallace RB y col. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 1987; 70: 1331-1337.
- Phillips RB. Inheritance of Q and C band polymorphisms. *Can J Genet Cytol* 1977; 19: 405-413.
- Pinkel D, Gray JW, Trask B y col. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986a; 51 Pt 1: 151-157.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986b; 83: 2934-2938.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C y col. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988b; 85: 9138-9142.



Pinkel D, Segraves R, Sudar D y col. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998a; 20: 207-211.

Pita M, Fernández JL, Gosálvez J. Whole-comparative genomic hybridization (W-CGH): 1. The quick overview of repetitive DNA sequences on a genome. *Chromosome Res* 2003; 11: 673-679.

Prosser J, Frommer M, Paul C y col. Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol* 1986; 187: 145-155.

Ribeiro EM, Cavalli IJ, Schmid AT y col. Cytogenetic analysis in human bone marrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 89: 21-26.

Riquet J, Mulsant P, Yerle M y col. Sequence analysis and genetic mapping of porcine chromosome 11 centromeric S0048 marker. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 74: 127-132.

Ritossa FM, Spiegelman S. Localization Of Dna Complementary To Ribosomal Rna In The Nucleolus Organizer Region Of Drosophila Melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965; 53: 737-745.

Rivero MT, Vazquez-Gundin F, Goyanes V y col. High frequency of constitutive alkali-labile sites in mouse major satellite DNA, detected by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 2001; 483: 43-50.

Roth MS, Antin JH, Bingham EL y col. Use of polymerase chain reaction-detected sequence polymorphisms to document engraftment following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1990; 49: 714-720.

Ruvolo M. Molecular phylogeny of the hominoids: inferences from multiple independent DNA sequence data sets. *Mol Biol Evol* 1997; 14: 248-265.

Ryder OA. Conservation genomics: applying whole genome studies to species conservation efforts. *Cytogenet Genome Res* 2005; 108: 6-15.

Saitou N. Evolution of hominoids and the search for a genetic basis for creating humanness. *Cytogenet Genome Res* 2005; 108: 16-21.

Samonte RV, Ramesh KH, Verma RS. Comparative mapping of human alphoid satellite DNA repeat sequences in the great apes. *Genetica* 1997; 101: 97-104.

Sanger F, Thompson EO. The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J* 1953; 53: 353-366.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-5467.

Sarich VM, Wilson AC. Immunological time scale for hominid evolution. *Science* 1967a; 158: 1200-1203.

Sarich VM, Wilson AC. Rates of albumin evolution in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967b; 58: 142-148.

Scherf B. World Watch List for Domestic Animal Diversity, 3rd edition. Rome, FAO/UNEP, 2000.

Schnedl W, Abraham R, Forster M y col. Differential fluorescent staining of porcine heterochromatin by chromomycin A3/distamycin A/DAPI and D 287/170. *Cytogenet Cell Genet* 1981; 31: 249-253.

Schrock E, du Manoir S, Veldman T y col. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497.

Schwarzacher T, Mayr B, Schweizer D. Heterochromatin and nucleolus-organizer-region behaviour at male pachytene of *Sus scrofa domestica*. *Chromosoma* 1984; 91: 12-19.

Sibley CG, Comstock JA, Ahlquist JE. DNA hybridization evidence of hominoid phylogeny: a reanalysis of the data. *J Mol Evol* 1990; 30: 202-236.

Slamovits CH, Rossi MS. Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. A review. *J Neotrop Mammal* 2002; 9: 297-308.

Smith GP. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 1976; 191: 528-535.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ y col. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; 321: 674-679.

Sol K, DuBow MS. Sequence analysis of cloned human satellite DNAs reveals nonrandom variations. *Genome* 1993; 36: 334-342.

Sparkes MC, Crist ML, Sparkes RS y col. Gene markers in human bone marrow transplantation. *Vox Sang* 1977; 33: 202-205.

Speicher MR, du Manoir S, Schrock E y col. Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1907-1914.

Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 782-792.

Stanyon R, Wienberg J, Romagno D y col. Molecular and classical cytogenetic analyses demonstrate an apomorphic reciprocal chromosomal translocation in Gorilla gorilla. *Am J Phys Anthropol* 1992; 88: 245-250.

Stephan W. Tandem-repetitive noncoding DNA: forms and forces. *Mol Biol Evol* 1989; 6: 198-212.

Stoka AM. Phylogeny and evolution of chemical communication: an endocrine approach. *J Mol Endocrinol* 1999; 22: 207-225.

Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 1972; 75: 304-306.

Sutton WS. On the morphology of the chromosome group in *Brachystola magna*. *Biological Bulletin* 1902; 4: 24-39.

Syvanen M. The evolutionary implications of mobile genetic elements. *Annu Rev Genet* 1984; 18: 271-293.

The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 2005; 437: 69-87.

The International Chimpanzee Chromosome 22 Consortium. DNA sequence and comparative analysis of chimpanzee chromosome 22. *Nature* 2004; 429: 382-388.

Thiede C, Florek M, Bornhauser M y col. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1055-1060.

Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol* 2004; 112: 16-23.

de la Torre J, López-Fernández C, Nichols R y col. Heterochromatin readjusting chiasma distribution in two species of the genus *Arcyptera*: The effect among individuals and populations. *Heredity* 1986; 56: 177-184.

Tschermak E. Über Künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Berichte der Deutsche Botanischen Gesellschaft* 1900; 18.

Tyler-Smith C, Willard HF. Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 390-397.

Venter JC, Adams MD, Myers EW y col. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.

Verma RS. Heteromorphisms of heterochromatin. Cambridge, Cambridge University Press, 1988.

Verma RS, Dosik H. Human chromosomal heteromorphisms: nature and clinical significance. *Int Rev Cytol* 1980; 62: 361-333.



Verma RS, Babu A. Comparative Genomic Hybridization. New York, McGraw-Hill Inc, 1995.

De Vries H. Sur la loi de disjonction des hybrides. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* 1900; 130: 845-847.

Walsh JB. Persistence of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics* 1987; 115: 553-567.

Warburton PE, Waye JS, Willard HF. Nonrandom localization of recombination events in human alpha satellite repeat unit variants: implications for higher-order structural characteristics within centromeric heterochromatin. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 6520-6529.

Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569-574.

Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1953a; 18: 123-131.

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953b; 171: 737-738.

White MJD. Animal cytology and evolution. Cambridge, Cambridge University Press, 1954.

Wichman HA, Payne CT, Ryder OA y col. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *J Hered* 1991; 82: 369-377.

Wienberg J. Fluorescence in situ hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate genome evolution. *Cytogenet Genome Res* 2005; 108: 139-160.

Willard HF. Evolution of alpha satellite. *Curr Opin Genet Dev* 1991; 1: 509-514.

Willard HF. Centromeres: the missing link in the development of human artificial chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 219-225.

Willard HF, Waye JS. Hierarchical Order In Chromosome-Specific Human Alpha-Satellite DNA. *Trends In Genetics* 1987; 3: 192-198.

Witherspoon RP, Schanfield MS, Storb R y col. Immunoglobulin production of donor origin after marrow transplantation for acute leukemia or aplastic anemia. *Transplantation* 1978; 26: 407-408.

Yoda K, Nakamura T, Masumoto H y col. Centromere protein B of African green monkey cells: gene structure, cellular expression, and centromeric localization. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5169-5177.

## **Bibliografía 220**

**Yunis JJ, Sawyer JR, Dunham K. The striking resemblance of high-resolution G-banded chromosomes of man and chimpanzee. *Science* 1980; 208: 1145-1148.**

**Yunis JJ, Prakash O. The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science* 1982; 215: 1525-1530.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero ofrecer mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado en esta etapa que ha supuesto el inicio de mi carrera científica:

A Turi, Iñaki, Moncho, Jaime, Carlos, Pepe, Carmen, Dani, Jony, JaimeD, Luis, Paqui, María, Mario, Joaquina, PepeM, Begoña, Altea, Jonás, Alfonso, Elba, Martha...

Macu!, Marta, Elena, Salva, Miguel Ángel, Carmelo, Chiqui...

A José Luis y a toda la gente del laboratorio de la Coruña (Lourdes, María Teresa, Belén, Susana, Alejandro, Fernando, Arancha), y también a Carmen y Manolo por hacerme tan sumamente agradable la *estancia breve* (una lástima que fuese breve). Y a Asun, además, gracias por sus excelentes preparaciones.

A Barbara Hamkalo por su excelente/s acogida/s y su ayuda, por la primera cena de Thanksgiving y también por el maletín. A Amanda y ----- por ejercer la tarea de tutor (en el peor sentido de la palabra) del chaval europeo, por sus ordenadores y su tarjeta de fotocopias. Y a la gente del laboratorio de James por las “magníficas” fiestas de cumpleaños. A Bob Moyzis por escucharme y darme valiosísimas pistas. A Francisco Ayala por las agradables inyecciones de español (y por el libro).

De aquí en adelante, históricamente, ya entra en acción Leah, quien merece un agradecimiento con mayúsculas, que no necesita ser escrito.

A Ollie Ryder y Marlys Houck por su atención y su interés. A la familia Rivas por su hospitalidad, sus sopas y su inolvidable (segunda) fiesta de Thanksgiving.

A Todd Disotell por su generosidad y su magnífica manera de entender la ciencia.

Al primo Luis por su gran amistad, por darme entera su casa, por su compañía, y por la tercera cena de Thanksgiving.

A Pedro García-Casado por la sangre de cerdos y por la excursión (y futuras excursiones) a Peñaranda. A su amigo ----

A Motse Bosch, a Xavier Domingo...

A Manu de Jaén,


A Lourdes por la maldita secuencia,

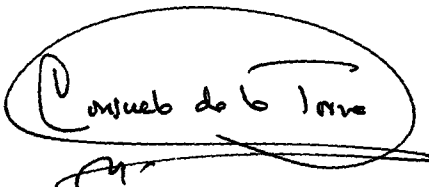
A José María y a Juan, entre otras cosas, por las lecciones de *word*,

[ ... ]

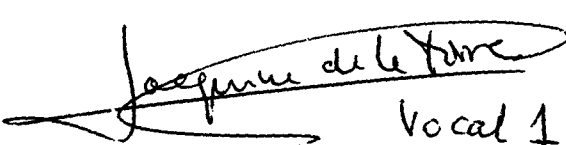
Y como en castellano no tenemos una forma que resulte muy fluida, no me queda más remedio que decirlo así: y para terminar, pero no por ello menos importantes (y añadido que *creo que quizá incluso más importantes*), también quiero mostrar mi agradecimiento a todos aquellos que no han participado directamente o ni siquiera tangencialmente en la elaboración directa de esta tesis, pero que me han aportado los *cimientos*, que considero imprescindibles, para haber podido llevar a acabo esta tarea (así como cualquier otra): familia y amigos. Muchísimas gracias.

signatario de la carta de presentación  
de la carta de presentación de la  
doctrina de la SONA SANTIESTE Cuba Libre  
del 22 febrero 2017

Vocal 3 =  


  
Vocal 1

  
Vocal 2

  
Vocal 1

  
Vocal 2